(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0038450
(43) 공개일자 2022년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7006075
(22) 출원일자(국제) 2020년07월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/044117
(87) 국제공개번호 WO 2021/021963
국제공개일자 2021년02월04일
(30) 우선권주장
62/880,044 2019년07월29일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
데베라 테라퓨틱스 인크.
미국 98102 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애비뉴 이스트 1600 스위트 300
(72) 발명자
델라니, 콜린
미국 98102 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애비뉴 이스트 1600 스위트 300 데베라 테라퓨틱스 인크. 내
스톨츠만, 캐리
미국 98102 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애비뉴 이스트 1600 스위트 300 데베라 테라퓨틱스 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

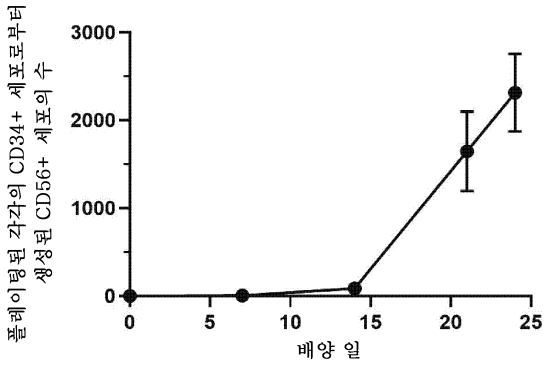
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 **면역치료를 위한 NK 세포 조성물 및 제제 및 이의 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 면역치료를 위한 NK 세포 조성물 및/또는 제제 및 이러한 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 사용하는 방법을 제공한다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 폭넓은 범위의 바이러스 감염, 박테리아 감염, 암 및 백혈병 악성종양, 및 다른 질환의 치료에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도17a



(52) CPC특허분류
A61K 39/001106 (2018.08)
A61K 39/001112 (2018.08)
A61K 39/001168 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 2501/145 (2013.01)
C12N 2501/2303 (2013.01)
C12N 2501/2306 (2013.01)
C12N 2501/42 (2013.01)

(72) 발명자
댐, 엘리자베스
미국 98102 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애비뉴 이스트 1600 스위트 300 데베라 테라퓨틱스 인크. 내
프리브, 메리
미국 98102 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애비뉴 이스트 1600 스위트 300 데베라 테라퓨틱스 인크. 내

(30) 우선권주장
62/892,779 2019년08월28일 미국(US)
62/960,507 2020년01월13일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

복수의 제대혈 또는 태반 혈액 세포를 서로에 면역학적으로 매칭시키지 않고 선택하는 단계;

적혈구 및 T 세포가 고갈된 풍부화된 $CD34^+$ 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)를 제조하는 단계;

$CD34^+$ 풍부화된 HSPC를 인터류킨-3 (IL-3), 인터류킨-6 (IL-6), 트롬보포이에틴 (TPO), Flt-3 리간드 (Flt-3L), 및 줄기 세포 인자 (SCF)를 포함하는 확장 배양 배지에서 Notch 리간드 및 재조합 인간 피브로넥틴 또는 그의 단편으로 코팅된 고체 상 상에서, 및 외인성 피더 세포의 부재 하에서, 충분한 시간 동안 배양하여 확장된 HSPC를 생산하는 단계이며; 여기서 확장된 HSPC는 확장 동안 $CD56^+$ 세포로 실질적으로 분화하지 않는 것인 단계; 및

확장된 HSPC를 유효량의 IL-2 및 IL-15, 비-동물 근원 혈청 대체물을 포함하는 분화 배양 배지에서, 및 외인성 피더 세포의 부재 하에서 충분한 시간 동안 배양하여 약 50 내지 약 80% $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 20% 내인성 $CD56^-$ 세포, 또는 약 50 내지 약 85% $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 15% 내인성 $CD56^-$ 세포를 포함하는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산하는 단계

를 포함하고;

여기서 $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, 및 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a, 저 내지 중간 빈도의 CD16을 발현하고, KIR을 실질적으로 발현하지 않고; $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현하는 것인, 면역치료에 사용하기 위한 자연 킬러 (NK) 세포 제제를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 확장 배양 배지가 외인성 IL-15, IL-7, IL-2, G-CSF, GM-CSF, LIF, MIP-1a, 또는 아릴 탄화수소 수용체 길항제를 함유하지 않는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, IL-15가 $CD34^+$ 풍부화된 HSPC의 확장 동안 첨가되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, IL-15가 확장 상의 마지막 약 4 내지 7일 동안 첨가되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 분화 배양 배지가 첨가된 Flt-3L, FGF-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-3, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1알파, SCF, IL-21, IL-18, 및 4-1BBL을 함유하지 않는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, IL-2 및 IL-15가 분화 배양 배지에 첨가되는 유일한 시토카인인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 분화 배양 배지가 외인성 항원 제시 세포를 함유하지 않는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 비-동물 혈청 대체물이 인간 AB 혈청, 신선한 동결된 인간 혈장, 또는 인간 혈소판 용해물인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, HSPC가 체세포, 배아 줄기 세포, 말초 혈액 단핵 세포 또는 유도 다능성 줄기 세포로부터 유래되지 않는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, NK 세포 조성물 및/또는 제제가 2% 미만의 $CD3^+$ 세포, 2% 미만의 $CD19^+$ 세포, 및/또는 2% 미만의 $CD34^+$ 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, $CD56^+$ 세포가 고 빈도의 KIR2DL4를 추가로 발현하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, Notch 리간드가 DXI 또는 Notch에 대해 특이적인 항체인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 세포가 유전자 변형된 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 유전자 변형이 확장 상 동안 또는 NK 세포의 분화에 후속하여 일어나는 것인 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 세포가 항원 인식 수용체를 발현하도록 유전자 변형된 것인 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변형이 TCR 또는 CAR을 발현하는 폴리뉴클레오티드의 도입인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, TCR 또는 CAR이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 종양 특이적, 또는 종양 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 바이러스 항원이 시토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인 바르 바이러스 (EBV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 단순 포진 바이러스 (HSV), 간염 바이러스, 지카 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 코로나바이러스에 존재하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 포진 바이러스가 HSV 1 또는 HSV 2이고, 간염 바이러스가 A, B, 또는 C형 간염이고, 코로나바이러스가 SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 종양 특이적 또는 종양 연관된 항원이 탄산 안히드라제 IX (CA1X), 암배아 항원 (CEA), CD8,

CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49c, CD49f, CD56, CD66c, CD73, CD74, CD104, CD133, CD138, CD123, CD142, CD44V6, 시토메갈로바이러스 (CMV) 감염된 세포의 항원 (예를 들어, 세포 표면 항원), 피부 림프구-연관된 항원 (CLA; P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 (PSGL-1)의 특수화된 글리코형), 상피 당단백질-2 (EGP-2), 상피 당단백질-40 (EGP-40), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나제 erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), 폴레이트-결합 단백질 (FBP), 태아 아세틸콜린 수용체 (AChR), 폴레이트 수용체-알파, 강글리오시드 G2 (GD2), 강글리오시드 G3 (GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제 (hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL-13R알파2), 카파-경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체 (KDR), 루이스 Y (LeY), L1 세포 부착 분자 (L1CAM), 흑색종 항원 패밀리 A, 1 (MAGE-A1), 뮤신 16 (MUC16), 뮤신 1 (MUC1), 메소텔린 (MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1, GP100, 프로테이나제3 (PR1), 티로시나제, 수르비빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, 암-고환 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원 (h5T4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, 테트라스파닌 8 (TSPAN8), 종양-연관된 당단백질 72 (TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2 (VEGF-R2), 윌름스 종양 단백질 (WT-1), BCMA, GPC3, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CRLF2, 또는 ERBB인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 종양 특이적 또는 종양 연관된 항원이 CD19, ROR1, Her2, PSMA, PSCA, 메소텔린, 또는 CD20인 방법.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 CD3제타, CD28, 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인; CD27, CD28, 4-1BB, 2B4, DAP10, DAP12, OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 또는 B7-H3의 공동-자극성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 공동-자극성 도메인; CD8, CD28, CD3제타, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, 또는 NKG2D의 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인; 및 IgG_1의 힌지 영역, 이뮤노글로불린의 CH_2CH_3 영역, CD3의 부분, CD28의 부분, 또는 CD8의 부분을 포함하는 스페이서 영역을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, CAR이 모노클로날 항체 FMC63의 CDR을 갖는 단일 쇄 Fv (scFv)를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, NK 세포 조성물 및/또는 제제가 동결보호제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체 내로의 주입을 위한 NK 세포 조성물을 형성하도록 NK 세포 제제를 제제화하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

약 50 내지 약 80% $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 20% 내인성 $CD56^-$ 세포, 또는 약 50 내지 약 85% $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 15% 내인성 $CD56^-$ 세포, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하며, 여기서 $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, NKG2D, 및 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a, 저 내지 중간 빈도의 CD16을 발현하고, KIR을 실질적으로 발현하지 않고; $CD56^-$ 세포가 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현하는 것인, 면역치료에 사용하기 위한 자연 킬러 (NK) 세포 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 제제가 외인성 피더 세포를 함유하지 않는 것인 NK 세포 조성물.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, Notch 리간드-확장된 HSPC로부터 생산되는 NK 세포 조성물.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 2% 미만의 $CD3^+$ 세포, 2% 미만의 $CD19^+$ 세포, 및/또는 2% 미만의 $CD34^+$ 세포를 포함하는 NK 세포 조성물.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, $CD56^+$ 세포가 고 빈도의 KIR2DL4를 추가로 발현하는 것인 NK 세포 조성물.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 세포가 유전자 변형된 것인 NK 세포 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 조성물의 세포가 항원 인식 수용체를 발현하도록 유전자 변형된 것인 NK 세포 조성물.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 유전자 변형이 TCR 또는 CAR을 발현하는 폴리뉴클레오티드의 도입을 포함하는 것인 NK 세포 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, TCR 또는 CAR이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 또는 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 것인 NK 세포 조성물 및/또는 제제.

청구항 35

제34항에 있어서, 바이러스 항원이 시토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인 바르 바이러스 (EBV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 단순 포진 바이러스 (HSV), 간염 바이러스, 지카 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 코로나바이러스에 존재하는 것인 NK 세포 조성물 및/또는 제제.

청구항 36

제35항에 있어서, 포진 바이러스가 HSV 1 또는 HSV 2이거나, 간염 바이러스가 A, B 또는 C형 간염이거나, 또는 코로나바이러스가 SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 NK 세포 조성물 및/또는 제제.

청구항 37

제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원이 탄산 안히드라제 IX (CA1X), 암배아 항원 (CEA), CD8, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49c, CD49f, CD56, CD66c, CD73, CD74, CD104, CD133, CD138, CD123, CD142, CD44V6, 시토메갈로바이러스 (CMV) 감염된 세포의 항원 (예를 들어, 세포 표면 항원), 피부 림프구-연관된 항원 (CLA; P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 (PSGL-1)의 특수화된 글리코형), 상피 당단백질-2 (EGP-2), 상피 당단백질-40 (EGP-40), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나제 erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), 폴레이트-결합 단백질 (FBP), 태아 아세틸콜린 수용체 (AChR), 폴레이트 수용체-알파, 강글리오시드 G2 (GD2), 강글리오시드 G3 (GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제 (hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL-13R알파2), 카파-경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체 (KDR), 루이스 Y (LeY), L1 세포 부착 분자 (L1CAM), 흑색종 항원 패밀리 A, 흑색종-연관된 항원 A1 (MAGE-A1), 뮤신 16 (MUC16), 뮤신 1 (MUC1), 메소텔린 (MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1, GP100, 프로테이나제3 (PR1), 티로시나제, 수르비빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, 암-고환 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원 (h5T4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, 테트라스파닌 8 (TSPAN8), 종양-연관된 당단백질 72 (TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2 (VEGF-R2), 윌름스 종양 단백질 (WT-1), BCMA, GPC3, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CRLF2, 또는 ERBB인 NK 세포

조성물 및/또는 제제.

청구항 38

제26항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원이 CD19, ROR1, Her2, PSMA, PSCA, 메소텔린, CRLF2, 또는 CD20인 NK 세포 조성물.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 인식 수용체가 CAR인 NK 세포 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, CAR이 CD3제타, CD28, 및 4-1BB의 세포내 신호전달 도메인; CD27, CD28, 4-1BB, 2B4, DAP10, DAP12, OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 또는 B7-H3 공동자극성 도메인의 적어도 하나의 공동-자극성 도메인; CD8, CD28, CD3제타, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, 또는 NKG2D의 막횡단 도메인; 및 IgG_1, 이뮤노글로불린의 CH_2CH_3 영역, CD3의 부분, CD28의 부분, 또는 CD8의 부분의 스페이서 영역을 포함하는 것인 NK 세포 조성물.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 항원이 CD19인 NK 세포 조성물.

청구항 42

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원이 HER2 또는 메소텔린인 NK 세포 조성물.

청구항 43

제26항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제를 추가로 포함하는 NK 세포 조성물.

청구항 44

제26항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체 내로의 주입을 위해 제제화된 NK 세포 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 세포를 포함하는 NK 세포 조성물.

청구항 46

제44항에 있어서, 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 $CD56^+$ 세포를 포함하는 NK 세포 조성물.

청구항 47

제26항 내지 제46항 중 어느 한 항의 NK 세포 조성물의 치료 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 대상체가 종양 항원을 발현하는 암을 갖고, 조성물의 NK 세포가 종양 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 발현하는 것인 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 대상체가 바이러스 또는 박테리아 감염을 갖고, 조성물의 NK 세포가 바이러스 또는 박테리아에 결합하는 항원 인식 수용체를 발현하는 것인 방법.

청구항 50

제47항에 있어서, 대상체가 바이러스 또는 박테리아 감염을 갖고, 대상체에게 제26항 내지 제31항 중 어느 한

항의 NK 세포 조성물 및/또는 제제가 투여되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, NK 세포 조성물이 동결보호제를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 7월 29일에 출원된 미국 가출원 번호 62/880,044, 2019년 8월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 62/892,779, 및 2020년 1월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 62/960,507의 우선권을 주장하며, 이들의 개시 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록에 관한 진술

[0004] 본 출원과 연관된 서열 목록은 종이 사본 대신 텍스트 형식으로 제공되며, 명세서에 참조로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 72246_Sequence_Final_2020-07-28.txt이다. 텍스트 파일은 144 KB이고; 2020년 7월 28일에 생성되었으며; 명세서의 출원과 함께 EFS-웹을 통해 제출되고 있다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 개시내용은 비-자가 면역치료를 위한 자연 킬러 (NK) 세포 조성물 및/또는 제제, 및 이러한 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 제조 및 사용하는 방법을 제공한다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 폭넓은 범위의 바이러스 및 박테리아 감염, 고형 종양 및 혈액 악성종양 (백혈병, 림프종)을 포함한 암, 및 다른 질환에 대한 치료에 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0007] 자연 킬러 (NK) 세포는 형질전환된 표적 세포에 대한 다양한 세포독성 활성, 예컨대 특정 시토카인의 생산, 직접 세포독성, 및 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC)의 매개를 나타내는 선천 면역계의 성분이다. NK 세포는 본질적으로 임의의 바이러스 감염된 또는 암 변형된 세포에 대한 숙주 방어 및 이들 세포의 청소에 있어서 핵심적 역할을 한다. 또한, NK 세포는 예를 들어, 변형된 암 세포를 청소하는 것을 포함한 다양한 상태의 면역치료를 위한 이펙터로서 제안되었다. NK 세포를 생산하기 위한 다양한 방법, 예컨대 유도 다능성 줄기 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 말초 혈액 줄기 또는 전구 세포, 또는 제대혈 줄기 또는 전구 세포로부터의 생성이 기재되었다. 각각의 근원에 대해, NK 세포의 특성은 그들의 생성 방법에 의존한다. 이러한 방법은 전통적으로 치료 목적을 위해 적당한 수의 NK 세포를 생산하는 많은 라운드의 생체외 세포 분열에 의존하였다. 이러한 프로세스로부터 생성된 NK 세포는 보다 성숙하는 경향이 있고/거나 환자에의 투여 후에 소진을 나타낼 가능성이 더 많다. NK 세포 소진은 예를 들어, 인터페론 감마 (IFNɣ), CD107a, 그랜자임 B 및/또는 퍼포린의 감소된 생산, 감소된 세포용해 활성 등에 의해 나타내어질 수 있다. 이러한 NK 세포는 생체내에서 투여되는 경우 덜 활성이거나 존속할 가능성이 있다. 따라서, 환자에의 투여 후에 보다 높은 수준의 활성 및/또는 존속을 나타내고 보유하는 치료 목적을 위한 NK 세포 집단 및 상기 NK 세포 집단을 포함하는 조성물, 뿐만 아니라 이러한 NK 세포 집단 및/또는 조성물을 생산하는 방법에 대한 필요가 남아 있다.

발명의 내용

[0008] 개시내용의 요약

[0009] 본 개시내용은 면역치료를 위한 NK 세포 제제의 조성물 및 이러한 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 제조 및 사용하는 방법을 제공한다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 폭넓은 범위의 바이러스 감염, 악성종양, 및 다른 질환에 대한 치료에 사용될 수 있다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 다수의 인간 공여자, 전형적으로 적어도 2명 또는 적어도 4명의 인간 공여자로부터, 또는 완전히 매칭된 또는 부분적으로 매칭된 (미스매칭된) 공여자로부터 유래된 $CD56^+$ (주로 NK) 세포로 구성될 수 있다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 풀링된, 비-HLA 매칭된 (비매칭된), $CD34^+$ 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)로부터, 면역학적으로 매칭된 HSPC로부터, 또는 부분적으로 면역학적으로 매칭된 (미스매칭된) HSPC로부터 시험관내에서 또는 생체외에서 HSPC의 확장, 이어서 $CD56^+$ (주로 NK)

세포로의 분화에 의해 제조될 수 있다. 중요하게는, 생성된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는, 면역학적으로 비매칭되든, 매칭되든 또는 미스매칭되든, $CD56^+$ (대개 NK) 세포 및 $CD56^-$ (비-NK) 세포의 혼합물을 포함한다. 개시된 방법에 의해 생산된 $CD56^+$ (NK) 세포는 매우 강력하지만, 전형적으로 성인 인간 공여자로부터 유래된 종래 기술에서의 필적하는 NK 세포보다 덜 성숙하며, 따라서 생체내에서 보다 많은 세포용해 활성 및/또는 존속을 나타낼 수 있다. 본원에 기재된 조성물 및/또는 제제에 존재하는 비-NK 세포는 전형적으로 골수 기원의 것이고, NK 세포 분화 및 활성화를 지지하여, 외인성 피더 세포 층에 대한 필요를 제거한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 80 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 20 % $CD56^-$ 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. $CD56^+$의 생성 동안 생산된 $CD56^-$ 세포는 $CD56^+$ 세포에 대해 내인성인 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 15 % $CD56^-$ 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개시된 방법에 의해 생산된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 55 % 내지 약 65 % $CD56^+$ 세포 및 약 45% 내지 약 35% $CD56^-$, 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생산된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 70 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 30 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다.

[0011] 상기 기재된 $CD56^+$ 하위집단은 주로 NK 세포로 구성된다. CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, 및/또는 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및/또는 CD107a, 저 내지 중간 빈도의 NKG2D를 발현할 수 있고, 킬러 세포 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR)를 실질적으로 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서 $CD56^+$ 세포는 KIR^-이다. (본원에 사용된 "KIR^-"는 KIR 패밀리 구성원 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다.) CD16 (Fc 감마 수용체 III (FcγRIII)으로도 공지됨)은 본원에 기재된 방법에 의해 시험관내에서 분화하도록 유도된 NK 세포 상에 저 또는 중간 빈도로 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현한다. 일부 실시양태에서 확장된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 다른 공여자의 HLA 유형에 매칭시키지 않고 및 NK 세포를 받을 환자의 HLA 유형에 매칭시키지 않고, 적어도 2명의 인간 공여자로부터 유래된 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서 확장된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 대상체에 대한 HLA 유형에 면역학적으로 매칭된 세포를 포함한다. 추가의 다른 실시양태에서 확장된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 대상체에 대해 적어도 부분적으로 면역학적으로 매칭된 (미스매칭된) 세포를 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제를 제조하는 시험관내 또는 생체외 방법이 제공된다. 방법은 전형적으로 복수의 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위를 서로에 매칭시키지 않고 선택하는 단계; 적혈구를 용해시키거나 다르게는 고갈시키는 단계; T 세포를 고갈시키는 단계; $CD34^+$ 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)에 대해 풍부화하는 단계; 이어서 $CD34^+$ 풍부화된 HSPC를 확장 배양 배지에서 및 피더 세포의 부재 하에서 충분한 시간 동안 배양하여 확장된 HSPC 세포 집단을 생산하는 단계이며; 여기서 확장된 HSPC는 확장 동안 $CD56^+$ (주로 NK) 세포로 실질적으로 분화하지 않는 것인 단계; 및 이어서 확장된 HSPC 세포 집단을 시토카인을 갖는 분화 배양 배지에서 및 피더 세포의 부재 하에서 충분한 시간 동안 배양하여 약 50 내지 약 80 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 20 % 내인성 $CD56^-$ 세포를 포함하는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 15% $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 55 % 내지 약 65 % $CD56^+$ 세포 및 약 45 % 내지 약 35 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 70 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 30 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. $CD56^+$ 하위집단은 주로 NK 세포로 구성된다. CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, 및 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a, 저 내지

중간 빈도의 NKG2D를 발현하고, KIR을 실질적으로 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서 $CD56^+$ 세포는 KIR^-이다. (본원에 사용된 "KIR^-"는 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다.) CD16은 저 또는 중간 빈도로 발현된다. 일부 실시양태에서, $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현한다.

[0013] 다른 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제를 제조하는 시험관내 또는 생체외 방법은 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위의 완전히 면역학적으로 매칭된 또는 미스매칭된 단위를 선택하는 단계를 포함한다. 면역학적 매칭은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위(들)를 선택하는 단계에 이어서, 방법은 적혈구를 용해시키거나 다르게는 고갈시키고; T 세포를 고갈시키고; $CD34^+$ 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)에 대해 풍부화하는 단계; 이어서 $CD34^+$ 풍부화된 HSPC를 확장 배양 배지에서 및 피더 세포의 부재 하에서 충분한 시간 동안 배양하여 확장된 HSPC 세포 집단을 생산하는 단계이며; 여기서 확장된 HSPC는 확장 동안 $CD56^+$ (주로 NK) 세포로 실질적으로 분화하지 않는 것인 단계; 및 이이서 확장된 HSPC 세포 집단을 시토카인을 갖는 분화 배양 배지에서 및 피더 세포의 부재 하에서 충분한 시간 동안 배양하여 약 50 내지 약 80 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 20 % 내인성 $CD56^-$ 세포를 포함하는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 15% $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 55 % 내지 약 65 % $CD56^+$ 세포 및 약 45 % 내지 약 35 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 다른 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 70 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 30 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. $CD56^+$ 하위집단은 주로 NK 세포로 구성된다. CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, 및 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a, 저 내지 중간 빈도의 NKG2D를 발현하고, KIR을 실질적으로 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서 $CD56^+$ 세포는 KIR^-이다. (본원에 사용된 "KIR^-"는 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다.) CD16은 또한 저 또는 중간 빈도로 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현할 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, HSPC가 비매칭된, 매칭된, 또는 미스매칭된 제대혈 단위로부터 기원하는지 여부와 무관하게, HSPC 확장 배양 배지는 Notch 리간드 및 피브로넥틴 또는 그의 단편으로 코팅된 고체 상 조직 배양 기질에 인터류킨-3 (IL-3), 인터류킨-6 (IL-6), 트롬보포이에틴 (TPO), Flt-3 리간드 (Flt-3L), 줄기 세포 인자 (SCF)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시험관내 또는 생체외 확장 배양 배지에서 HSPC에 첨가되는 유일한 성장 인자는 IL-3, IL-6, TPO, Flt-3L, 및 SCF이다. 일부 실시양태에서, HSPC 확장 배양 배지에서 Notch 리간드는 델타$1^{ext-IgG}$이다. 일부 실시양태에서, 피브로넥틴 또는 그의 단편은 재조합 인간 피브로넥틴 또는 그의 단편이다.

[0015] 이제 확장된 HSPC의 분화는 그의 단리, 및 분화를 유도하는 IL-2 및 IL-15로 보충된 세포 배양 배지에서의 단리된 HSPC의 시험관내 또는 생체외 배양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시험관내 또는 생체외 분화 배양 배지에 첨가되는 유일한 시토카인은 IL-2 및 IL-15이다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 IL-2 및 IL-15의 양은 약 25 U/ml 내지 약 100 U/ml의 IL-2 및 약 25 ng/ml 내지 약 50 ng/ml의 IL-15이다. 다른 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 IL-2 및 IL-15의 양은 IL-2에 대해 약 50 U/ml 및 IL-15에 대해 약 40 ng/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 중의 시토카인은 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 여기서 다른 시토카인, 예컨대 Flt-3L, 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), IL-6, IL-7, IL-12, IL-3, GM-CSF, 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 대식세포 억제 단백질 1 알파 (MIP-1α), SCF, IL-21, IL-18, 및 4-1BBL (4-1BB 리간드)은 분화 배양 배지에 첨가되지 않는다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지는 NK 세포의 분화를 유도하는데 사용되는 첨가된 IL-2 및 IL-15 이외의 첨가된 시토카인을 함유하지 않는다.

[0016] 본 개시내용의 특정 실시양태에서, IL-15는 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 분화를 프라이밍하기 위해 $CD34^+$ 풍

부화된 HSPC의 확장 동안 첨가된다. IL-15는 확장 상의 마지막 4 내지 7일 동안 첨가될 수 있다. 확장 상이 7일로 감소되는 경우, IL-15로의 프라이밍은 마지막 약 4일 동안일 수 있다. 이제 확장된 및 프라이밍된 HSPC의 분화는 그의 단리, 및 분화를 유도하는 IL-2 및 IL-15로 보충된 세포 배양 배지에서의 단리된 HSPC의 시험관내 또는 생체외 배양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시험관내 또는 생체외 분화 배양 배지에 첨가되는 유일한 시토카인은 IL-2 및 IL-15이다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 IL-2 및 IL-15의 양은 약 25 U/ml 내지 약 100 U/ml의 IL-2 및 약 25 ng/ml 내지 약 50 ng/ml의 IL-15이다. 다른 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 IL-2 및 IL-15의 양은 IL-2에 대해 약 50 U/ml 및 IL-15에 대해 약 40 ng/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 중의 시토카인은 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 여기서 다른 시토카인, 예컨대 Flt-3L, 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), IL-6, IL-7, IL-12, IL-3, GM-CSF, 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 대식세포 억제 단백질 1 알파 (MIP-1α), SCF, IL-21, IL-18, 및 4-1BBL (4-1BB 리간드)은 분화 배양 배지에 첨가되지 않는다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지는 NK 세포의 분화를 유도하는데 사용되는 첨가된 IL-2 및 IL-15 이외의 첨가된 시토카인을 함유하지 않는다.

[0017] 본 방법의 특정 실시양태에서 분화 배지를 보충하는데 사용되는 비-동물 근원 단백질은 인간 AB 혈청, 신선한 동결된 인간 혈장, 또는 인간 혈소판 용해물이다. 또한, 특정 실시양태에서 HSPC는 체세포, 배아 줄기 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 또는 유도 다능성 줄기 세포로부터 유래되지 않는다.

[0018] 본 개시내용의 특정 실시양태에서 방법은 2% 미만의 CD3+ 세포, 2% 미만의 CD19+ 세포, 및/또는 2% 미만의 CD34+ 세포를 포함하는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산한다. 조성물 및 또는 제제의 $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 KIR2DL4를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서 방법은 DXI 또는 Notch에 대해 특이적인 항체인 Notch 리간드의 사용을 포함한다.

[0019] 특정 실시양태에서 방법은 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 유전자 변형을 포함한다. 특정 구체적인 실시양태에서 유전자 변형은 확장 상 동안 수행되고, 다른 것에서 유전자 변형은 NK 세포의 분화에 후속하여 수행된다. NK 세포 조성물 및/또는 제제의 세포는 항원 인식 수용체를 발현하도록 유전자 변형될 수 있다. 특정 구체적인 실시양태에서 유전자 변형은 T 세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 폴리뉴클레오티드의 도입이다. TCR 또는 CAR은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 또는 종양 특이적 또는 종양 연관된 항원에 특이적으로 결합하도록 디자인될 수 있다.

[0020] 개시된 방법의 특정 실시양태에서 바이러스 항원은 시토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인 바르 바이러스 (EBV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 단순 포진 바이러스 (HSV), 간염 바이러스, 지카 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 코로나바이러스에 존재한다. 구체적인 실시양태에서, 포진 바이러스는 HSV 1 또는 HSV2이고, 간염 바이러스는 A, B 또는 C형 간염이고, 코로나바이러스는 SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2이다.

[0021] CAR이 종양 특이적 또는 종양 연관된 항원에 관한 것인 특정 다른 실시양태에서 항원은 CD19, ROR1, Her2, PSMA, PSCA, 메소텔린, 또는 CD20일 수 있다.

[0022] CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 CD3제타, CD28, 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인; CD27, CD28, 4-1BB, 2B4, DAP10, DAP12, OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 또는 B7-H3의 공동-자극성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 공동-자극성 도메인; CD8, CD28, CD3제타, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, 또는 NKG2D의 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인; 및 IgG_1의 힌지 영역, 이뮤노글로불린의 CH_2CH_3 영역, CD3의 부분, CD28의 부분, 또는 CD8의 부분을 포함하는 스페이서 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서 CAR은 모노클로날 항체 FMC63의 CDR을 갖는 단일 쇄 Fv (scFv)를 포함할 수 있다.

[0023] 특정 실시양태에서 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 NK 세포 조성물 및 제제는 대상체 내로의 주입을 위해 제제화될 수 있다.

[0024] 본원에 개시된 특정 실시양태에서 면역치료에 사용하기 위한 자연 킬러 (NK) 세포 조성물이 생산된다. 조성물은 약 50 내지 약 80% $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 20% 내인성 $CD56^-$ 세포, 또는 약 50 내지 약 85% $CD56^+$ 세포 및 약 50 내지 약 15% 내인성 $CD56^-$ 세포 (여기서 $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, NKG2D, 및 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a, 저 내지 중간 빈도의 CD16을 발현하고, KIR을 실질적으로 발현하지 않고; $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼

포린을 발현함), 및 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서 NK 세포 조성물은 외인성 피더 세포를 함유하지 않는다.

[0025] 특정 실시양태에서, NK 세포 조성물은 2 % 미만의 $CD3^+$ 세포, 및/또는 2 % 미만의 $CD19^+$ 세포, 및/또는 2 % 미만의 $CD34^+$ 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서 NK 세포 조성물은 고 빈도의 KIR2DL4를 추가로 발현하는 $CD56^+$ 세포를 포함한다.

[0026] 본원에 기재된 NK 세포 조성물은 유전자 변형된 세포를 포함할 수 있다. 조성물의 유전자 변형된 세포는 항원 인식 수용체를 발현하도록 유전자 변형될 수 있다. 이들 항원 인식 수용체는 TCR 또는 CAR을 발현하는 도입된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 특정 구체적인 실시양태에서 TCR 또는 CAR은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 또는 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 보다 구체적인 실시양태에서, 바이러스 항원은 시토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인 바르 바이러스 (EBV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 단순 포진 바이러스 (HSV), 간염 바이러스, 지카 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 코로나바이러스에 존재한다. 보다 바람직한 실시양태에서 포진 바이러스는 HSV 1 또는 HSV 2이고, 간염 바이러스는 A, B 또는 C형 간염이고, 코로나바이러스는 SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2이다.

[0027] 특정 실시양태에서 TCR 또는 CAR을 포함하는 NK 세포 조성물 및/또는 제제에서, 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원에 대해 특이적인 TCR 또는 CAR은 탄산 안히드라제 IX (CA1X), 암배아 항원 (CEA), CD8, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49c, CD49f, CD56, CD66c, CD73, CD74, CD104, CD133, CD138, CD123, CD142, CD44V6, 시토메갈로바이러스 (CMV) 감염된 세포의 항원 (예를 들어, 세포 표면 항원), 피부 림프구-연관된 항원 (CLA; P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 (PSGL-1)의 특수화된 글리코형), 상피 당단백질-2 (EGP-2), 상피 당단백질-40 (EGP-40), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나제 erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), 폴레이트-결합 단백질 (FBP), 태아 아세틸콜린 수용체 (AChR), 폴레이트 수용체-알파, 강글리오시드 G2 (GD2), 강글리오시드 G3 (GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제 (hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL-13R알파2), 카파-경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체 (KDR), 루이스 Y (LeY), L1 세포 부착 분자 (L1CAM), 흑색종 항원 패밀리 A, 1 (MAGE-A1), 뮤신 16 (MUC16), 뮤신 1 (MUC1), 메소텔린 (MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1, GP100, 프로테이나제3 (PR1), 티로시나제, 수르비빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, 암-고환 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원 (h5T4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, 테트라스파닌 8 (TSPAN8), 종양-연관된 당단백질 72 (TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2 (VEGF-R2), 윌름스 종양 단백질 (WT-1), BCMA, GPC3, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CRLF2, 및 ERBB에 대해 특이적이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원은 CD19, ROR1, Her2, PSMA, PSCA, 메소텔린, CRLF2, 또는 CD20이다.

[0028] NK 세포가 항원 인식 수용체를 포함하는 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 CAR일 수 있다. 보다 구체적인 실시양태에서 CAR은 CD3제타, CD28, 및 4-1BB의 세포내 신호전달 도메인; CD27, CD28, 4-1BB, 2B4, DAP10, DAP12, OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 또는 B7-H3 공동자극성 도메인의 적어도 하나의 공동-자극성 도메인; CD8, CD28, CD3제타, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, 또는 NKG2D의 막횡단 도메인; 및 IgG1, 이뮤노글로불린의 CH_2CH_3 영역, CD3의 부분, CD28의 부분, 또는 CD8의 부분의 스페이서 영역을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서

[0029] 특정 실시양태에서 NK 세포 조성물은 동결보호제를 추가로 포함할 수 있고, NK 세포 조성물은 장래의 사용을 위해 동결된다. 특정 구체적인 실시양태에서 NK 세포 조성물은 대상체 내로의 주입을 위해 제제화된다. 제제는 조성물을 저장하는데 사용되는 동결보호제를 포함할 수 있다. NK 세포 조성물은 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서 NK 세포 조성물은 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 $CD56^+$ 세포를 포함할 수 있다.

[0030] 본 개시내용은 또한 상기 기재된 NK 세포 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 대상체는 예를 들어 종양 항원을 발현하는 암을 가질 수 있고, 조성물의 NK 세포는 종양 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 발현한다. 다른 실시양태에서 대상체는 바이러스 또는 박테리아 감염을 갖는다. 특정 실시양태에서, NK 세포 조성물은 종양 특이적 또는 연관된 항원, 바이러스 항원, 또는 박테리아 항원에 대해 특이적인 키메라 항원 수용체를 발현한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 본 방법 및 조성물 및/또는 제제의 상기 측면 및 많은 수반되는 이점은 첨부된 도면과 함께 취해질 때, 하기 상세한 설명을 참고로 보다 잘 이해될 것인 바와 같이 보다 용이하게 이해될 것이다:

도 1a 및 1b는 실시예 1에 기재된 프로세스에 따라 생산된 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 20개의 뱃치로부터의 결과를 나타낸다. 도 1a는 28-일 배양의 과정 (상 1 및 2)에 걸친 $CD56^+$ 세포/출발 $CD34^+$ 세포의 증가를 나타낸다. 도 1b는 28-일 세포 배양 프로세스에 걸친 $CD56^+$ 세포 생성의 재현성을 입증한다.

도 2는 소 태아 혈청 (FBS)의 인간 AB 혈청 (hABS) 또는 인간 혈소판 용해물 (hPL)로의 대체가 분화 동안 세포 확장에 대한 최소 효과를 가졌음을 나타낸다.

도 3은 FBS의 인간 AB 혈청 (hABS) 또는 인간 혈소판 용해물 (hPL)로의 대체가 생산된 $CD56^+$ 세포의 퍼센트에 대한 최소 효과를 가졌음을 나타낸다.

도 4는 배양의 상 2 (분화 상)에 사용된 상이한 혈청 보충물을 비교하는 배양의 제28일에 $CD56^+$ NK 세포에 비해 $CD16^+$ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 5는 배양의 상 2에 사용된 상이한 혈청 보충물을 비교하는 배양의 제28일에 $CD56^+$ NK 세포에 비해 $NKp46^+$ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 6은 hPL로 보충된 배양물이 hABS로 보충된 것들보다 더 많은 세포독성 NK 세포 집단을 발달시켰음을 나타낸다.

도 7은 hPL로 보충된 배양물이 hABS로 보충된 것들보다 더 많은 세포독성 NK 세포 집단을 발달시켰음을 나타낸다.

도 8은 NK 세포 조성물 및/또는 제제 (NK 세포 생성물로 지칭됨)가 유사한 활성을 갖는 K562 및 A549 표적 세포에 대해 활성이고 (그래프의 중간에서 채워진 원 및 삼각형으로 지시된 곡선), A549 표적 세포에 대해 활성화된 성체 NK 세포보다 더 강력하였음을 나타낸다.

도 9는 NK 세포 조성물 및/또는 제제가 많은 시험된 암 세포주에 대해 세포 살해를 입증하였음을 나타낸다. 각각의 세포주에 대해, 좌측 막대는 4시간에서의 세포독성을 나타내고, 우측 막대는 24시간에서의 세포독성을 나타낸다. K562 세포주는 NK 세포 활성에 대한 허용된 표준물이고, 양성 대조군으로서 역할을 한다.

도 10은 NK 세포 생성물이 염수 주사 대조군과 비교하여 종양 부담을 감소시킬 수 있었음을 입증한다.

도 11a 및 11b는 생체내 마우스 모델에서의 종양 반응을 나타낸다. 도 11a는 이 연구에 대한 시간 경과에 따른 비처리 대조군 (원을 갖는 선)에 대한 및 NK 세포 조성물 및/또는 제제 (정사각형을 갖는 선)에 대한 종양 크기의 그래프이다. NK 세포 조성물은 종양 진행의 유의한 지연을 유발할 수 있었다. 도 11b는 종양에서 인간 $CD45^+$ 세포를 검출함으로써 측정된 바와 같이, NK 세포 조성물이 존속하였고, 주사 후 37일에 검출가능하였음을 나타낸다.

도 12a 내지 12d는 Notch 1 항체 (본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 번호 2017/0107493 참조)로의 HSPC의 확장이 DXI를 사용한 확장과 필적하였음을 나타낸다.

도 13a 및 13b는 NK 세포 조성물 및/또는 제제 (NK 세포 생성물로 지칭됨), K562, 또는 A549 종양 세포가 단독으로, 또는 함께 3일 동안 배양되었음을 나타낸다. 연구는 삼중으로 실행하였다. 3일 후, 시토카인 수준을 루미넥스(Luminex) 검정에 의해 결정하였다. (사용된 검정의 검출의 한계는 1 pg/ml의 시토카인이었다). IFNɣ (도 13a) 및 TNFα (도 13b) 수준 둘 다는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 종양 세포의 존재 하에서 공동-배양한 경우 증가하였다. 이들 결과는 제제 중의 NK 세포가 종양 세포의 존재 하에서 보다 활성이 되었음을 나타내었다.

도 14a 내지 14e는 제1일, 제4일, 제7일, 제14일, 또는 제21일에 형질도입 후에 세포 계통에 걸친 트랜스진 발현의 보다 일관된 분포가 관찰되었음을 나타낸다.

도 15는 발현 구축물이 선택가능한 마커로서 tEGFR을 포함하였음을 나타낸다. S = GM-CSF R로부터의 신호

서열; V_L = 가변 경쇄; L = 링커; V_H = 가변 중쇄; H = 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서; TM = CD28 또는 NKG2D 막횡단 도메인; 4-1BB = 세포내 신호전달 도메인; CD3제타 = 세포내 신호전달 도메인; 2A = 자기-절단 펩티드.

도 16은 발현 구축물이 NK 세포의 지지를 위한 인간 IL-15를 포함하였음을 나타낸다. S = GM-CSF R로부터의 신호 서열; V_L = 가변 경쇄; L = 링커; V_H = 가변 중쇄; H = 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서; TM = CD28 또는 NKG2D 막횡단 도메인; 4-1BB = 세포내 신호전달 도메인; CD3제타 = 세포내 신호전달 도메인; 2A = 자기-절단 펩티드.

도 17a 및 17b는 NK 세포 분화를 프라이밍하기 위해 확장 상 동안 첨가된 IL-15가 $CD56^+$ 세포의 유의한 증가를 생성하고, 프로세스가 재현가능함을 나타낸다. 도면은 제조 규모에서 생산된 NK 세포 제제의 4개의 뱃치로부터의 결과를 나타낸다. 도 17a는 24-일 배양의 과정 (상 1 및 2)에 걸친 CD56+ 세포/출발 CD34+ 세포의 증가를 나타낸다. 도 17b는 24-일 세포 배양 프로세스에 걸친 CD56+ 세포 생성의 재현성을 입증한다.

도 18a 내지 18c는 연장된 지속기간에 걸쳐 표적 세포의 반복 용량을 일련적으로 살해하는 NK 세포 제제의 능력을 나타낸다. 도 18a는 신선한 NK 세포 제제이다. 도 18b는 동결보존되고 해동된 NK 세포 제제이고, 도 18c는 신선한 NK 세포 제제가 총 10일 동안 3일마다 표적 세포의 반복 용량을 받은 검정이다.

도 19는 카즈미(Kasumi)-1 AML 미만성 종양 모델에서의 NK 세포 제제의 활성을 나타낸다. 모델을 생물발광 영상화를 통해 카즈미-1 종양 부담을 측정함으로써 NK 세포 제제 처리가 있는 또는 없는 NSG 마우스에서 시험하였다. 완충제-주사된 대조군 처리에 비해, NK 세포 제제는 종양 진행을 유의하게 억제하였다.

도 20은 도 19에 사용된 카즈미 1 AML 모델에서의 NSG 마우스 생존을 나타낸다. NK 세포 제제는 완충제 대조군으로 주사된 마우스와 비교하여 마우스에서 중위 생존을 유의하게 연장시켰다.

도 21은 형질도입된 $CD56^+$ 및 $CD56^-$ 세포에서의 CAR 발현의 간접적 척도로서 tCD19 트랜스진 발현의 유동 세포계측법-기반 검출을 나타낸다. 플롯은 EF1알파 프로모터에 의해 유도된 메소텔린 표적화된 CAR 및 말단절단된 CD19 (tCD19) 세포외 도메인을 발현하는 렌티바이러스 벡터로의 형질도입 후 배양의 제28일에 세포에서의 CD56 발현 및 tCD19 발현의 빈도를 나타낸다. 벌크한 세포를 확장의 제7일에 3시간 떨어져 30의 MOI를 사용하여 2회 형질도입시켰다.

도 22는 24-시간 시험관내 세포독성 검정에서의 NOMO-1 또는 $NOMO\text{-}1^{MSLN-/-}$ AML 종양 세포에 대한 MSLN CAR-NK 세포 또는 대조군 NK 세포의 세포독성 활성을 나타낸다. MSLN 발현 NOMO-1 세포에 대한 MSLN CAR-NK 세포에 의한 종양 세포 살해의 유의하고 특이적인 증가가 있지만, $NOMO\text{-}1^{MSLN-/-}$ 종양 세포에 대해서는 그렇지 않다. NOMO-1 세포 +/- MSLN 넉아웃에 대한 대조군 NK 세포로는 살해의 차이가 관찰되지 않았다.

도 23은 풍부화된 $CD56^+$ 세포에서의 CAR 발현의 간접적 척도로서 tCD19 트랜스진 발현의 유동 세포계측법-기반 검출을 나타낸다. 플롯은 EF1알파 프로모터에 의해 유도된 메소텔린-표적화된 CAR 및 말단절단된 CD19 (tCD19) 세포외 도메인을 발현하는 렌티바이러스 벡터로의 형질도입 후 배양의 제27일에 세포에서의 CD56 발현 및 tCD19 발현 (Tx^+)의 빈도를 나타낸다. $CD56^+$ 세포를 자기 비드 분리에 의해 풍부화하고, 분화 상에서 배양의 제23일에 40의 MOI를 사용하여 형질도입하였다.

도 24는 24-시간 시험관내 세포독성 검정에서의 NOMO-1 세포 또는 $NOMO\text{-}1^{MSLN-/-}$ 세포에 대한 CAR-NK 세포 또는 대조군 NK 세포의 세포독성 활성을 나타낸다. MSLN 발현 NOMO-1 세포에 대한 MSLN CAR-NK 세포에 의한 종양 세포 살해의 유의하고 특이적인 증가가 있지만, $NOMO\text{-}1^{MSLN-/-}$ 세포에 대해서는 그렇지 않다. NOMO-1 세포 +/- MSLN 넉아웃에 대한 대조군 NK 세포로는 살해의 차이가 관찰되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 구체적인 실시양태의 상세한 설명

[0033] 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가의 임의의 방법 및 물질이 본 세포 조성물 및/또는 제제의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 특정 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 본 개시내용의 목적상, 하기 용어는 하기 정의된다.

[0034] 본원에 사용된 "확장된 HSPC"는 생체외에서 조혈 줄기 세포, 또는 조혈 줄기 및 전구 세포를 확장시키는 기술로 처리된 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포를 지칭하며, 기술은 (i) 이렇게 확장된 세포의 분취물에서, 조혈 줄기 세포, 또는 조혈 줄기 및 전구 세포의 수의 증가, 또는 (ii) 이렇게 확장된 세포의 분취물로 주입된 비-비만성 당뇨병성 (NOD)/SCID 마우스에서 증진된 생착에 의해 나타내어진 바와 같이 제한-희석 분석에 의해 결정된 중증 복합 면역결핍증 (SCID) 재집단화 세포의 증가된 수를 발생시키는 것으로 나타났다. 이들은 확장 기술로 처리되지 않은 세포의 분취물로 보여지는 것에 비한 것이다. (미국 특허 출원 공개 번호 2013/0095079; 문헌 [Delaney *et al.*, *Nature Med.* 16(2):232-236, 2010] 참조). 전형적으로, 조혈 줄기 세포, 또는 줄기 및 전구 세포는 $CD34^+$이다. 일부 실시양태에서, 조혈 줄기 세포, 또는 조혈 줄기 및 전구 세포는 인간 제대혈 및/또는 인간 태반 혈액으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 확장된 줄기 세포는 Notch-효능제 확장 방법을 사용하여 제조된다. 일부 실시양태에서, 확장된 줄기 세포는 델타$1^{ext-IgG}$ (DXI) 확장 방법을 사용하여 제조된다.

[0035] 본원에 사용된 "화학치료 요법"은 사용되는 약물, 그들의 투여량, 치료의 빈도 및 지속기간, 및 다른 고려사항을 한정하는 화학치료를 위한 요법을 지칭한다. 이러한 요법은 화학치료와 조합으로 몇몇 화학치료 약물을 조합할 수 있다. 오늘날 화학치료에 사용되는 약물의 대다수는 세포정지성 또는 세포독성이다.

[0036] 본 개시내용은 면역치료를 위한 자연 킬러 (NK) 세포 제제를 포함하는 조성물 및 이러한 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 사용하는 방법을 제공한다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 혈액 및 비-혈액 악성종양을 포함한 폭넓은 범위의 바이러스 감염, 악성종양, 및 다른 질환에 대한 치료에 사용될 수 있다. NK 세포 조성물 및/또는 제제는 풀링된, 확장된 $CD34^+$ 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)로부터 생산된다. 전형적으로, 적어도 2명 이상, 또는 최대 적어도 4명의 상이한 인간 공여자로부터의 HSPC는 생체외 확장 전에 또는 후에 조합되고 풀링되어 확장된 HSPC 세포 집단을 생성한다. 이어서 확장된 세포 집단은 생체외에서 분화되어 $CD56^+$ 및 $CD56^-$ 세포의 혼합물을 포함하는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생성한다. $CD56^+$ 세포는 우세하게는 NK 세포이다. 세포 조성물 및/또는 제제의 부분을 구성하는 $CD56^-$ 세포는 전형적으로 골수 기원의 것이고, NK 세포 분화 및 분화 동안의 활성화를 지지한다. $CD56^+$의 생체외 생성 동안 생산된 $CD56^-$ 세포는 $CD56^+$ 세포에 대해 내인성인 것으로 간주된다.

[0037] 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 80 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 20 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 55 % 내지 약 65 % $CD56^+$ 세포 및 약 45 % 내지 약 35 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 70 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 30 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다.

[0038] CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 자연 킬러 세포 단백질 NKp30, NKp46, NKp44, 및 NKG2A, 및 그랜자임 B; 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a; 저 내지 중간 빈도의 NKG2D를 발현할 수 있고; KIR을 실질적으로 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서 $CD56^+$ 세포는 KIR^-이다. (본원에 사용된 "KIR^-"는 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다). 일부 실시양태에서, CD16은 저 빈도로 발현된다. 일부 실시양태에서, CD16은 중간 빈도로 발현된다. 일부 실시양태에서, $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 하기 특징을 갖는다.

[0040] 다양한 NK 마커의 발현의 빈도는 하기 표에 나타내어진다.

[0041] 표 1. NK 세포 마커 발현의 빈도

[0042] $CD56^+$ 세포

[0043] 그랜자임 B+ 고

[0044] 퍼포린$^{+}$중간 내지 고

[0045] CD107a^{+}중간

[0046] CD16^{+}저 내지 중간

[0047] NKp30^{+}고

[0048] NKp44^{+}고

[0049] NKp46^{+}고

[0050] NKG2A^{+}고

[0051] NKG2D^{+}저 내지 중간

[0052] KIR 실질적으로 없음

[0053] CD56^{-} 세포

[0054] 그랜자임 B^{+}중간 내지 고

[0055] 퍼포린$^{+}$저

[0056] CD107a^{+}고

[0057] CD15^{+}CD14^{+}중간

[0058] CD15^{+}CD14^{-}저 내지 중간

[0059] CD15^{-}CD14^{+}저 내지 중간

[0060] CD15^{-}CD14^{-}의 CD11b^{+}CD11V^{+}고

[0061] 고 발현은 약 60 내지 약 100 %의 빈도를 지칭한다. 중간 발현은 약 20 내지 약 60 %의 빈도를 지칭한다. 저 발현은 약 1 내지 약 20 %의 빈도를 지칭한다. 실질적으로 없음은 1 % 미만의 발현의 빈도를 지칭한다. 본원에 사용된 "KIR^{-}"는 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다.

[0062] 일부 실시양태에서, CD56^{+} 및 CD56^{-} 세포에 대한 마커의 범위는 표 2 및 3에 나열된 바와 같다:

[0063] 표 2. $CD56^+$ 세포에 대한 NK 세포 마커의 범위

$CD56^+$ 세포	**빈도 (평균 ± SD)**	**범위**
$CD56^+$ 집단	60.7 ± 14.7	27.0 - 80.0
$CD56^+$ 세포 내의 하위세트		
그랜자임 B^+	89.6 ± 7.1	79.1 - 98
퍼포린$^+$	61.0 ± 12.3	51.9 - 81.5
$CD107a^+$	49.7 ± 5.7	42.9 - 58.8
$CD16^+$	18.4 ± 12.9	4.0 - 30.0
$NKp30^+$	84.1 ± 10.9	68.7 - 92.8
$NKp44^+$	80.0 ± 7.1	81.1 - 88.9
$NKp46^+$	85.4 ± 3.2	81.6 - 8.8
$NKG2A^+$	73.6 ± 2.0	70.4 - 85.4
$NKG2D^+$	7.3 ± 1.2	6.3 - 8.1
KIR^+	0.14 ± 0.04	0.10 - 0.16

[0064]

[0065] 표 3. $CD56^-$ 세포에 대한 NK 세포 마커의 범위

$CD56^-$ 세포	**빈도 (평균 ± SD)**	**범위**
$CD56^-$ 집단	39.3 ± 14.7	20.0 - 73.0
$CD56^-$ 집단 내의 하위세트		
그랜자임 B^+	64.4 ± 21.6	27.4 - 82.3
퍼포린$^+$	1.5 ± 0.3	1.2 - 2.0
$CD107a^+$	89.3 ± 4.6	82.7 - 95.0
$CD15^+CD14^+$	28.7 ± 3.7	24.3 - 33.7
$CD15^+CD14^-$	19.8± 5.4	15.3 - 28.9
$CD15^-CD14^+$	18.3 ± 9.0	21.4 - 2.9
$CD11b^+CD11c^+$ ($CD15^-$ $CD14^-$ 집단 내의)	76.6 ± 6.4	70.3 - 81.4

[0066]

[0067] 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 2 % 미만의 $CD3^+$ 세포 (T 세포)를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 1 % 미만의 $CD3^+$ 세포 (T 세포)를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 2 % 미만의 $CD19^+$ 세포 (B 세포)를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 1 % 미만의 $CD19^+$ 세포 (B 세포)를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 2 % 미만의 $CD34^+$ 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 1 % 미만의 $CD34^+$ 세포 (HSPC)를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 2 % 미만의 $CD19^+$ 세포 (B 세포), 2 % 미만의 $CD3^+$ (T 세포) 및 2 % 미만의 $CD34^+$ 세포 (HSPC)를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 1 % 미만의 $CD19^+$ 세포, 1 % 미만의 $CD3^+$ (T 세포) 및 1% 미만의 $CD34^+$ 세포 (HSPC)를 함유한다.

[0068] 인간에서, NK 세포는 상이한 인간 백혈구 항원 (HLA) 부류 I 대립유전자에 의해 제시되는 동종이형 결정자를 인식하는 클론적으로 분포된 킬러 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR)에 의해 조절된다. 억제성 KIR은 일반적으로 우성이고, NK 세포가 자가 세포를 살해하는 것을 방지한다. 본 방법에 의해 제조된 NK 세포 조성물 및/또는 제

제는 MHC 부류 I 억제성 신호를 결여한다. 고 수준의 NKG2A를 발현하면서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 성체 NK 세포보다 시험관내에서 더 활성일 수 있다.

[0069] 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 수용체 표현형은 자연 세포독성 수용체 NKp30, NKp44, NKp46의 고 빈도의 발현을 추가로 포함할 수 있는 반면, $CD56^+$ 세포에 의한 NKG2D의 저 내지 중간 빈도의 발현을 갖는다. 본 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 $CD56^+$ 세포는 저 내지 중간 CD16 발현에 의해 추가로 확인될 수 있다.

[0070] 본 개시내용의 분화된 NK 세포는 활성화된 말초 혈액 NK 세포와 유사하거나 그보다 더 큰 수준으로 다양한 종양 세포주를 용해시키는 그들의 능력에 의해 추가로 확인된다 (실시예에 추가로 기재된 바와 같음). 따라서 배양에서 세포의 세포독성 능력을 측정하여 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 특징을 확인할 수 있다.

[0071] 본 개시내용의 방법에 기재된 바와 같은 생체외에서 분화된 NK 세포의 제제는 2가지 별개의 상을 포함하고, 여기서 확장된 HSPC를 생성하는 HSPC의 확장을 수반하는 제1 상이 있고, 제1 상은 확장된 HSPC가 분화되어 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 형성하는 제2 상에 의해 이어진다. 종래 기술과 대조적으로, 피더 세포는 어느 상에서도 사용되지 않는다.

[0072] 확장된 HSPC는 (예를 들어, Notch 리간드로) 생체외에서 확장되고 T 세포 및 적혈구 둘 다가 고갈된 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포를 포함한다. 확장된 HSPC는 전형적으로 $CD34^+$ 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포이고, 전형적으로 HLA-매칭되지 않은 상이한 인간 공급원으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 확장된 HSPC는 상이한 인간 제대혈 공급원 및/또는 태반 혈액 공급원으로부터의 $CD34^+$ 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포이다. 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포는 다수의 HLA-유형을 포함하는데, 이는 HSPC가 풀링 전에 서로에 매칭되지 않기 때문이다. 본원에 사용된 T 세포가 고갈된은 확장된 HSPC 중의 2 % 미만의 $CD3^+$ 세포 (T 세포), 또는 1 % 미만의 $CD3^+$ 세포 (T 세포), 또는 0.5 % 미만의 $CD3^+$ 세포 (T 세포), 또는 0.1 % 미만의 $CD3^+$ 세포 (T 세포)를 지칭한다.

[0073] 특정 실시양태에서 조혈 줄기 세포 또는 조혈 줄기 및 전구 세포는 면역치료로서 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 받아야 하는 환자에 면역학적으로 매칭되었다. 면역학적 매칭은 완전한 매치 또는 최대 2개, 3개, 또는 때때로 4개의 면역유형의 부분적 미스매치일 수 있다. 조혈 줄기 세포 또는 조혈 줄기 및 전구 세포를 포함하는 대다수의 조성물에서 가장 통상적인 HLA 항원, 예컨대, 예를 들어, HLA A-2, HLA-B7 등, 또는 HLA 계통에 의한 고 빈도 조합에서 매칭되었다. 매칭의 선택은 치료되는 환자 집단에 따라 선택될 것이다.

[0074] 일부 실시양태에서, $CD34^+$ 조혈 줄기 세포 또는 조혈 줄기 및 전구 세포는 제대혈로부터 및/또는 태반 혈액으로부터 유래된다 (인간 제대혈 또는 인간 태반 혈액). 이러한 혈액은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, 인간의 출생시 제대 및 태반 혈액의 수집의 논의에 대한, 미국 특허 번호 5,004,681 및 7,147,626 및 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0095079를 참조한다. 제대혈 및/또는 인간 태반 혈액 수집은 멸균 조건 하에서 이루어진다. 수집시, 제대 및/또는 태반 혈액은 항응고제, 예컨대 CPD (시트레이트-포스페이트-덱스트로스), ACD (산 시트레이트-덱스트로스), 알세버 용액 (Alsever *et al.*, *N. Y. St. J. Med.* 41:126, 1941), 드 고윈 용액 (De Gowin, *et al.*, *J. Am. Med. Ass.* 114:850, 1940), 에드글루게이트-Mg (Smith, *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 38:573, 1959), 라우스-터너 용액 (Rous and Turner, *J. Exp. Med.* 23:219, 1916), 다른 글루코스 혼합물, 헤파린, 에틸 비스쿠마세테이트 등과 혼합될 수 있다. 일반적으로, 문헌 [Hurn, Storage of Blood, Academic Press, New York, pp. 26-160, 1968)]을 참조한다. 한 실시양태에서, ACD가 사용될 수 있다.

[0075] 제대혈은 바람직하게는 제대로부터의 직접적 배수에 의해 및/또는 뿌리에서 및 확대된 정맥에서 분만된 태반으로부터의 바늘 흡인에 의해 얻어질 수 있다. 바람직하게는, 수집된 인간 제대혈 및/또는 태반 혈액은 오염 (예를 들어, 박테리아 또는 바이러스), 및 특히, 바이러스 오염이 없다.

[0076] 제대혈의 수집 전에, 제대혈 세포가 예를 들어, 유전성 또는 감염성 질환, 예컨대 암, 백혈병, 면역 장애, 신경학적 장애, 간염, 또는 HIV/AIDS의 전파를 제기할 수 있는 위험을 확인하기 위해 모체 건강 내력이 결정될 수 있다. 수집된 제대혈은 예를 들어, 세포 생존율, HLA 유형결정, ABO/Rh 유형결정, CD34+ 세포 카운트, 및 총 유핵 세포 카운트 중 하나 이상에 대한 시험을 겪을 수 있다.

[0077] 제대혈 및/또는 태반 혈액이 출생시 인간 공여자로부터 수집되면, 혈액을 프로세싱하여 풍부화된 HSPC를 생산한다. 바람직하게는, HSPC는 $CD34^+$ 세포 또는 우세하게는 $CD34^+$ 세포이다. HSPC는 전형적으로 T 세포 및 적혈구가 고갈되어, 풍부화된 HSPC를 발생시킨다. 본원에 사용된 T 세포의 고갈은 약 2 % 미만의 $CD3^+$ 세포, 약 1 % 미만의 $CD3^+$ 세포, 또는 약 0.5 % 미만의 $CD3^+$ 세포, 또는 약 0.1 % 미만의 $CD3^+$ 세포의 존재를 지칭한다. 따라서 풍부화는 세포 집단 중의 HSPC의 백분율이 (풍부화 절차 전의 집단 중의 백분율에 비해) 증가되는 프로세스를 지칭한다. 정제는 풍부화의 한 예이다.

[0078] 풍부화를 위한 프로세싱 전에, 수집된 제대 및/또는 태반 혈액은 신선할 수 있거나 이전에 동결보존되었을 수 있다. 세포 분리/선택을 위한 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 기술은 HSPC에 대한 풍부화를 수행하는데 사용될 수 있다. 세포 표면 마커의 차등적 발현에 의존하는 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포 표면 마커 CD34를 발현하는 세포는 CD34를 발현하는 세포가 CD34를 발현하지 않는 세포로부터 분리되도록 CD34에 대해 특이적인 모노클로날 항체를 사용하여 양성으로 선택될 수 있다. 더욱이, 채용되는 분리 기술은 바람직하게는 선택되는 세포의 생존율을 최대화한다. 채용되는 특정 기술은 분리의 효율, 방법론의 세포독성, 성능의 용이성 및 속도, 및 세련된 장비 및/또는 기술적 기교에 대한 필요성에 의존한다.

[0079] 분리를 위한 절차는 항체-코팅된 자기 비드를 사용한 자기 분리, 친화도 크로마토그래피, 및 고체 매트릭스, 예를 들어, 플레이트에 부착된 항체로의 "패닝", 또는 또 다른 편리한 기술을 포함할 수 있다. 정확한 분리/선택을 제공하는 기술은 다양한 정도의 기교성, 예를 들어, 복수의 컬러 채널, 저각 및 둔각 광 산란 검출 채널, 임피던스 채널 등을 가질 수 있는 형광 활성화된 세포 분류기를 포함한다.

[0080] 선택 프로세스에 사용되는 항체는 특정 세포 유형의 분리의 용이성을 허용하고, 직접 분리를 허용하는 마커, 예컨대 자기 비드; 지지체에 결합된 아비딘 또는 스트렙타비딘에 부착시킴으로써 제거를 가능하게 하는 비오틴; 형광 활성화된 세포 분류기로 사용될 수 있는 형광색소; 등과 접합될 수 있다. 잔류 세포의 생존율에 과도하게 유해하지 않은 임의의 기술이 채용될 수 있다.

[0081] 바람직한 실시양태에서, 신선한 제대혈 단위 및 동결되고 해동된 제대혈 단위는 특이적 모노클로날 항체에 커플링된 산화철 및 덱스트란으로 구성된 나노-크기 초-상자성 입자를 채용하는, 자기 세포 분리기, 예를 들어, 클리니막스(CliniMACS)® 세포 분리 시스템 (밀테니 비오텍(Miltenyi Biotec), 독일 베르기쉬 글라드바흐)과 관련되어 자기 입자에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된 항-CD34 항체를 사용하여 $CD34^+$ HSPC에 대해 풍부화하도록 프로세싱된다. 클리니막스® 세포 분리기는 단일-사용 일회용 튜빙 세트를 갖춘 폐쇄된 멸균 시스템이다. 일회용 튜빙 세트는 $CD34^+$ HSPC를 풍부화하기 위해 수집된 제대 및/또는 태반 혈액의 단일 단위를 프로세싱하는데 사용되고, 그 후에 버려질 수 있다.

[0082] 전형적인 실시양태에서, 2개 이상, 또는 최대 적어도 4개 이상의 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위는 HSPC에 대해 풍부화하기 전에 풀링될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, $CD34^+$ HSPC의 개별적 집단은 HSPC에 대해 풍부화한 후에 풀링될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 풀링되는 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위, 또는 HSPC의 집단의 수는 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40개, 또는 적어도 임의의 상기 수이다. 풀링되는 HSPC의 개별적 집단의 수는 예를 들어, 각각의 개별적 집단에서의 세포의 수, 및/또는 특정 환자 및 의도되는 면역치료에 필요한 세포의 수에 의존할 수 있다. 일부 실시양태에서, 풀은 2 내지 8개, 4 내지 8개, 2 내지 10개, 4 내지 10개, 4 내지 20개, 또는 4 내지 25개, 및 20 또는 25개 이하의 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위, 또는 $CD34^+$ HSPC 집단을 함유한다. 전형적인 실시양태에서 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위 또는 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포 집단은 HSPC의 HLA-유형과 무관하게 풀링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 풀 중의 세포는 인종 또는 민족과 무관하게 조합된다. 일부 실시양태에서, 풀 중의 세포는 동일한 인종, 예를 들어, 아프리카-미국인, 백인, 아시아인, 히스패닉계, 미국 원주민, 호주 원주민, 이뉴잇족, 태평양 섬주민의 개체의 제대혈 및/또는 태반 혈액으로부터 유래되거나, 동일한 민족, 예를 들어, 아일랜드인, 이탈리아인, 인도인, 일본인, 중국인, 러시아인 등의 개체의 제대혈 및/또는 태반 혈액으로부터 유래된다. 덜 통상적인 실시양태에서, 세포는 환자에 매칭된 또는 부분적으로 매칭된 개별적 세포 집단으로부터의 것일 수 있다. 이용가능한 충분한 수의 매칭된 또는 부분적으로 매칭된 단위가 있는 경우, 단위는 풀링될 수 있지만; 특정 환자를 매칭시키는 단위를 발견하기 위한 때때로-곤란한 프로세스를 고려하여, 풀링은 통상적으로 매칭된 또는 미스매칭된 단위에 대해 수행되지 않는다.

[0083] 전형적으로, HSPC에 대한 풍부화 전에, 제대혈 및/또는 태반 혈액의 적혈구 및 백혈구는 분리된다. 일부 실시

양태에서, 적혈구의 고갈은 백혈구로부터 적혈구의 분리를 지칭한다. 적혈구 및 백혈구의 분리가 일어났으면, 적혈구 분획은 버릴 수 있고, 백혈구 분획은 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 자기 세포 분리기에서 프로세싱하여 $CD34^+$ HSPC에 대해 풍부화할 수 있다. 백혈구 및 적혈구 분획의 분리는 예를 들어, 원심분리 기술을 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 분리 방법은 상업적으로 입수가능한 제품, 피콜(FICOLL)™ 또는 피콜-파크(FICOLL-PAQUE)™ 또는 퍼콜(PERCOLL)™ (지이 헬스케어(GE Healthcare), 미국 뉴저지주 피스캐터웨이)의 사용을 포함한다. 피콜-파크™는 통상적으로 원뿔형 튜브의 바닥에 정치되고, 전혈은 위에 층상화된다. 원심분리된 후, 하기 층은 상부로부터 하부로 원뿔형 튜브에서 볼 수 있다: 혈장 및 다른 구성요소, 단핵 세포 (백혈구)를 함유하는 버피 코트로 지칭되는 단핵 세포의 층, 및 펠릿 형태로 존재할 것인 적혈구 및 과립구. 이 분리 기술은 단핵 세포의 용이한 수거를 허용한다.

[0084] 임의로, CD34+ 세포 선택 전에, 제대혈 및/또는 태반 단위의 분취물은 총 유핵 세포 카운트 및/또는 $CD34^+$ 세포 함량에 대해 점검될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, $CD34^+$ 세포 선택 후에, $CD34^+$ 및 $CD34^-$ 세포 분획 둘 다는 회수된다. 임의로, 비록 다른 제대혈 및/또는 태반 혈액 세포에 대한 $CD34^+$ 세포의 HLA 매칭이 전형적으로 수행되지 않더라도, DNA는 초기 HLA 유형결정 및 장래의 키메라현상 연구를 위해 $CD34^-$ 세포 분획의 샘플로부터 추출될 수 있다.

[0085] $CD34^+$ 풍부화된 HSPC는 이어서 확장 전에, 저장 또는 수송을 위해 예를 들어, 적절한 세포 배양 배지 중의 현탁액에 의해 프로세싱될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 $CD34^+$ HSPC의 생존율의 유지에 적합한 세포 배양 배지이다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 혈청-무함유, 시토카인-무함유, 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포 배양 배지일 수 있으며, 여기에 성장 인자는 예를 들어, 하기 농도로 첨가된다: 50 내지 300 ng/ml의 줄기 세포 인자 (SCF), 50 내지 300 ng/ml의 Flt-3 수용체 리간드 (Flt3L), 50 내지 100 ng/ml의 트롬보포이에틴 (TPO), 50 내지 100 ng/ml의 인터류킨-6 (IL-6), 및 10 ng/ml의 인터류킨-3 (IL-3). 보다 구체적인 실시양태에서, 세포 배양 배지는 300 ng/ml의 줄기 세포 인자, 300 ng/ml의 Flt-3 수용체 리간드, 100 ng/ml의 TPO, 100 ng/ml의 IL-6 및 10 ng/ml의 IL-3; 또는 50 ng/ml의 SCF, 50 ng/ml의 Flt-3L, 50 ng/ml의 TPO, 50 ng/ml의 IL-6 및 10 ng/ml의 IL-3을 함유한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 10 ng/ml 재조합 인간 인터류킨-3 (rhIL-3), 50 ng/ml 재조합 인간 인터류킨-6 (rhIL-6), 50 ng/ml 재조합 인간 트롬보포이에틴 (rhTPO), 50 ng/ml 재조합 인간 Flt-3 리간드 (rhFlt-3L), 50 ng/ml 및 재조합 인간 줄기 세포 인자 (rhSCF)로 보충된 혈청 무함유, 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포 배양 배지 (예를 들어, 스템스팬(STEMSPAN)™ 혈청 무함유 확장 배지 또는 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 II (스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies), 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버))를 포함하거나, 또는 대안적으로 이로 이루어진다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 재조합 인간 rhSCF, rhFlt-3L, rhTPO, rhIL-6 (각각 50 ng/ml 최종 농도로), 및 rhIL-3 (10 ng/ml 최종 농도로)으로 보충된 혈청-무함유 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포 배양 배지 (예를 들어, 스템스팬 혈청 무함유 확장 배지 II (SFEM II, 스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버))로 이루어진다.

[0086] 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위는 적혈구 고갈되고, 적혈구 고갈된 분획 중의 $CD34^+$ 세포의 수가 결정된다. 일부 실시양태에서, 적혈구의 고갈은 백혈구로부터의 적혈구의 분리 또는 $CD34^+$ 세포로부터의 적혈구의 분리를 지칭한다. 바람직하게는, 3백5십만개 초과의 $CD34^+$ 세포를 함유하는 제대혈 및/또는 태반 혈액 단위는 상기 기재된 풍부화 방법으로 처리된다.

[0087] HSPC가 상기 기재된 풍부화 방법 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 방법에 따라 (예를 들어, 출생시 인간으로부터 수집된 인간 제대혈 및/또는 인간 태반 혈액으로부터) 단리된 후에, 풍부화된 HSPC는 HSPC, 예를 들어, $CD34^+$ HSPC의 수를 증가시키기 위해 확장된다. HSPC는 HSPC가 성장하고 분열하여 (증식하여) 확장된 $CD34^+$ HSPC 집단을 얻도록 (예를 들어, 유사분열을 촉진시키는) 세포 성장 조건 하에서 확장 배양 배지에서 배양된다. HSPC의 확장 동안, HSPC의 NK 세포로의 최소 분화가 일어난다 (즉, 생성된 세포의 2 % 미만 또는 1 % 미만은 NK 세포이다). 한 실시양태에서, 출생시 단일 인간의 제대혈 및/또는 태반 혈액으로부터 각각 유래된 HSPC의 개별적 집단은 확장 전에 또는 후에, 다른 HSPC의 HLA 유형에 매칭시키지 않고 풀링될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, HSPC는 풀링 전에 확장된다. 바람직하게는, 확장에 사용되는 기술은 HSPC의 비확장된 집단에 비해 확장된 HSPC에서 조혈 줄기 세포, 또는 조혈 줄기 및 전구 세포, 예를 들어, $CD34^+$ 세포의 수의 증가를 발생시키는

것으로 나타난 것이고, 여기서 비확장된 세포 집단 및 확장된 세포 집단은 HSPC의 동일한 공급원의 상이한 분취물로부터의 것이고, 확장된 HSPC는 확장 기술로 처리되지만, 비확장된 HSPC는 그렇지 않다.

[0088] 확장 기술은 미국 특허 번호 7,399,633 B2; 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0095079; 문헌 [Delaney *et al.*, *Nature Med.* 16(2): 232-236, 2010] (본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것들; 뿐만 아니라 하기 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0089] 일부 실시양태에서, HSPC는 혈청 무함유이고 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포의 배양에 적합한 확장 배양 배지에서, 성장 인자의 존재 하에서 시험관내에서 또는 생체외에서 배양되고, HSPC가 증식하여 HSPC의 확장된 집단을 생성하도록 (예를 들어, 유사분열을 촉진시키는) 세포 성장 조건에 노출된다.

[0090] 예시적인 실시양태에서, 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포의 확장에 적합한 확장 배양 배지는 혈청 무함유, 배양 배지, 예컨대 하기 기재된 바와 같은 Notch 리간드 및 성장 인자를 갖는 비-동물 근원 BSA, 재조합 인간 인슐린, 인간 트랜스페린, 2-머캅토에탄올, 및 다른 보충물을 함유하는 이스코브(Iscove) MDM이다. 다른 실시양태에서, 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포 배양 배지는 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 (스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버), 또는 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 II (스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버)이다.

[0091] 일부 실시양태에서, HSPC는 소정량의 Notch 리간드 (즉, 분화를 억제하는데 유효한 Notch 기능의 효능제), 전형적으로 Notch 기능의 고정화된 효능제의 존재 하에서, 확장 배양 배지에서 배양되고, HSPC가 증식하여 확장된 HSPC 집단을 생성하도록 (예를 들어, 유사분열을 촉진시키는) 세포 성장 조건에 노출된다. HSPC의 NK 세포로의 분화는 확장 상 동안 최소화된다 (즉, 생성된 세포의 2 % 미만 또는 1 % 미만은 NK 세포이다). 보다 바람직한 실시양태에서, 확장 배양 배지는 분화 및 성장 인자를 억제하는데 유효한 소정량의 Notch 기능의 효능제를 함유하고, HSPC는 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포가 증식하여 확장된 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포 집단을 얻도록 (예를 들어, 유사분열을 촉진시키는) 세포 성장 조건에 노출된다. 확장된 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포 집단은 전형적으로 확장 후에 분화 세포 배양 배지로 옮겨진다. 임의로, Notch 리간드는 분화 상 전에 불활성화되거나 확장된 HSPC 세포 집단으로부터 제거된다 (예를 들어, 분리 또는 희석에 의해).

[0092] 일부 실시양태에서, 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 또는 그 초과 동안 확장을 위해 배양되거나; 또는, 바람직하게는, 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포는 적어도 10일 또는 약 7 내지 약 14일 동안 확장을 위해 배양된다. 일부 실시양태에서, 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포는 약 7일, 약 14일, 약 13일 또는 약 15일 동안 배양된다. 확장의 지속기간은 목적하는 세포 제제의 생성에 필요한 줄기 및 전구 세포 면역표현형적 품질/특징을 보유하면서 목적하는 또는 최대 세포 수를 달성하는 능력에 의해 결정될 것임이 주목되어야 한다. 확장은 세포 증식이 정지하거나, 생존율이 감소하는 경우, 또는 세포가 HSPC의 품질/특징을 실질적으로 소실하기 시작한 경우 중지될 것이다.

[0093] 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포를 확장시키기 위한 예시적인 생체외 배양 조건은 세포를 7 내지 14일 동안 피브로넥틴 단편 및 인간 IgG의 Fc 도메인에 융합된 델타 단백질의 세포외 도메인 (델타1$^{ext-IgG}$)의 존재 하에서 하기 인간 성장 인자로 보충된 혈청 무함유, 확장 배양 배지에서 배양하는 것을 포함한다: SCF, Flt-3L, TPO, IL-6 및 IL-3. 바람직하게는, 상기 성장 인자는 하기 농도로 존재한다: 50 내지 300 ng/ml SCF, 50 내지 300 ng/ml Flt-3L, 50 내지 100 ng/ml TPO, 50 내지 100 ng/ml IL-6 및 10 ng/ml IL-3. 보다 구체적인 실시양태에서, 300 ng/ml SCF, 300 ng/ml의 Flt-3L, 100 ng/ml TPO, 100 ng/ml IL-6 및 10 ng/ml IL-3, 또는 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml의 Flt-3L, 50 ng/ml TPO, 50 ng/ml IL-6 및 10 ng/ml IL-3이 사용된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 확장 배양 배지 (예를 들어, 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 (스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버))는 10 ng/ml 재조합 인간 인터류킨-3 (rhIL-3), 50 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTPO, 50 ng/ml rhFlt-3L, 50 ng/ml 및 rhSCF를 함유하거나, 이로 이루어진다. 또 다른 보다 바람직한 실시양태에서, 확장 배양 배지 (예를 들어, 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 II (SFEM II, 스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버))는 rhSCF, rhFlt-3L, rhTPO, rhIL-6 (각각 50 ng/ml 최종 농도로), 및 rhIL-3 (10 ng/ml 최종 농도로)을 함유하거나, 이로 이루어진다.

[0094] 일부 실시양태에서, Notch 리간드는 DXI (델타1$^{ext-IgG}$)이고, 확장 상은 하기와 같이 수행된다: 델타1$^{ext-IgG}$ (DXI)를 세포 배양 디쉬(들)의 표면 상에 고정화한다. 구체적인 실시양태에서, 세포 배양 디쉬를 4℃에서 밤새 (또는 37℃에서 최소 2시간 동안) 2.5 μg/ml 델타1$^{ext-IgG}$ 및 5 μg/ml 레트로넥틴(RetroNectin)® (또한 rFN-CH-

296으로 지칭되는 재조합 인간 피브로넥틴 단편)으로 포스페이트 완충 염수에서 코팅한 후, 풍부화된 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포를 첨가한다. 바람직하게는 확장 배양 배지 (예를 들어, 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 또는 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 II (스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버))는 10 ng/ml rhIL-3, 50 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTPO, 50 ng/ml rhFlt-3L, 및 50 ng/ml rhSCF로 보충된다.

[0095] 일부 실시양태에서, 확장 배양 배지는 rhIL-3, rhIL-6, rhTPO, rhFlt-3L, 및 rhSCF 이외의 성장 인자를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 확장 배양 배지는 하기 첨가된 성장 인자 또는 시토카인을 함유하지 않는다: IL-7, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1a, IL-2 또는 IL-15. 일부 실시양태에서, 확장 배양 배지는 하기 첨가된 성장 인자 또는 시토카인을 함유하지 않는다: IL-7, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1a, 또는 IL-2. 일부 실시양태에서, 확장 배양 배지는 아릴 탄화수소 수용체 길항제, 예컨대 미국 특허 번호 9,175,266 또는 미국 특허 출원 공개 번호 2018/0237749 (둘 다 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것들을 함유하지 않는다.

[0096] 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포의 확장 후, 세포 및 생존 $CD34^+$ 세포의 총 수가 결정될 수 있다. 예를 들어, 확장 동안 제14일에, 샘플은 총 생존 유핵 세포 카운트의 결정을 위해 취해질 수 있다. 또한, $CD34^+$ 세포의 총 수는 다중-파라미터 유동 세포계측법에 의해, 및 따라서 샘플 중의 $CD34^+$ 세포의 백분율이 결정될 수 있다. 전형적으로, $CD34^+$ 세포의 절대 수의 적어도 10배 증가를 발생시키지 않은 배양은 중단된다. 바람직한 실시양태에서, 5천만개 미만의 $CD34^+$ 생존 세포를 함유하는 집단은 버려질 수 있다.

[0097] 생존율은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 트리판 블루 배제 또는 7-AAD 배제에 의해 결정될 수 있다. 생존 $CD34^+$ 세포의 백분율은 유동 세포계측법 및 생존 세포에 의해 배제되는 염색의 사용에 의해 평가될 수 있다. 생존 $CD34^+$ 세포의 백분율 = 샘플의 분취물에서 7-AAD (또는 다른 적절한 염색)를 배제하는 $CD34^+$ 세포의 수 나누기 분취물의 총 세포 수 (TNC; 생존 및 비-생존 둘 다). 샘플 중의 생존 $CD34^+$ 세포는 하기와 같이 계산될 수 있다: 생존 $CD34^+$ 세포 = 샘플의 TNC x 샘플 중의 % 생존 $CD34^+$ 세포. 생존 $CD34^+$ 세포에서의 풍부화 또는 확장 동안 비례적 증가는 하기와 같이 계산될 수 있다: 배양 후 총 생존 $CD34^+$ 세포/배양 전 총 생존 $CD34^+$ 세포.

[0098] 일부 실시양태에서, 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포는 상기 기재된 바와 같이, 세포를 생체외에서 확장 배양 배지에서 및 Notch 기능의 효능제 및 1종 이상의 성장 인자 또는 시토카인의 존재 하에서 주어진 기간 동안 배양함으로써 확장된다. Notch 효능제 또는 Notch 리간드로도 지칭되는 Notch 기능의 효능제는 Notch 경로 기능의 활성화를 촉진시키는, 즉, 유발하거나 증가시키는 작용제이다. 본원에 사용된 "Notch 기능"은 Notch의 세포내 도메인의 핵 전위, RBP-Jκ 또는 그의 드로소필라(*Drosophila*) 동족체 헤어리스 서프레서(Suppressor of Hairless)의 핵 전위; 스플리트(Split) 복합체의 인핸서, 예를 들어, 마스터마인드(Mastermind)의 *bHLH* 유전자의 활성화; *HES-1* 유전자 또는 *KBF2* (CBF1로도 지칭됨) 유전자의 활성화; 드로소필라 신경모세포 분리의 억제; 및 델타, 재그드(Jagged)/세레이트(Serrate), 프린지(Fringe), 델텍스(Deltex) 또는 RBP-Jκ/헤어리스 서프레서, 또는 그의 동족체 또는 유사체에의 Notch의 결합을 포함하나 이에 제한되지는 않는, Notch 신호전달 (신호전달) 경로에 의해 매개되는 기능을 의미한다. Notch 신호 전달 경로 및 활성화에 대한 그의 효과의 논의에 대해서는 일반적으로 리뷰 논문 [Kopan *et al.*, *Cell* 137:216-233, 2009]을 참조하며; 또한 문헌 [Jarriault *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 18:7423-7431, 1998]을 참조한다.

[0099] Notch 활성화는 세포를 Notch 효능제에 노출시킴으로써 수행된다. Notch 기능의 효능제는 고체 상 상에 고정화된 분자일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 Notch 효능제는 Notch의 세포외 도메인에 결합하고 Notch 신호 전달을 활성화시키는 세포외 결합 리간드 델타 및 세레이트, 또는 Notch의 세포외 도메인에 결합하고 Notch 신호 전달을 활성화시키는 델타 또는 세레이트의 단편이다. 델타 및 세레이트의 핵산 및 아미노산 서열은 인간을 포함한 몇몇 종으로부터 단리되었고, 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 국제 특허 공개 번호 WO 93/12141, WO 96/27610, WO 97/01571, 및 문헌 [Gray *et al.*, *Am. J. Path.* 154:785-794, 1999]에 개시되어 있다. (모두 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0100] 바람직한 실시양태에서, Notch 효능제는 myc 에피토프 태그에 융합된 단백질의 세포외 도메인으로 이루어진 델타 또는 세레이트 단백질 (각각 델타$^{ext-myc}$ 또는 세레이트$^{ext-myc}$)의 고정화된 단편, 또는 IgG의 Fc 부분에 융합된 단백질의 세포외 도메인으로 이루어진 델타 또는 세레이트 단백질 (각각 델타$^{ext-IgG}$ 또는 세레이트$^{ext-IgG}$)의 고정

화된 단편이다. Notch 효능제는 Notch 단백질 및 그의 유사체 및 유도체 (단편을 포함함); Notch 경로의 다른 요소인 단백질 및 그의 유사체 및 유도체 (단편을 포함함); 그에 대한 항체 및 그의 결합 영역을 함유하는 이러한 항체의 단편 또는 다른 유도체; 단백질 및 유도체 또는 유사체를 코딩하는 핵산; 뿐만 아니라 Notch 경로 활성이 촉진되도록 Notch 단백질 또는 Notch 경로의 다른 단백질에 결합하거나 다르게는 그와 상호작용하는 단백질 및 그의 유도체 및 유사체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 효능제는 세포내 도메인을 포함하는 Notch 단백질 및 그의 유도체, 상기를 코딩하는 Notch 핵산, 및 Notch 리간드의 Notch-상호작용 도메인 (예를 들어, 델타 또는 세레이트의 세포외 도메인)을 포함하는 단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 효능제는 RBPJκ/헤어리스 서프레서 또는 델텍스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 프린지는 예를 들어 델타 단백질과 함께 Notch 활성을 향상시키는데 사용될 수 있다. 이들 단백질, 그의 단편 및 유도체는 재조합적으로 발현되고 단리될 수 있거나, 화학적으로 합성될 수 있다.

[0101] 추가의 또 다른 실시양태에서, Notch의 효능제는 Notch 신호전달 경로의 구성원에 결합하는 펩티드모방체 또는 펩티드 유사체 또는 유기 분자이다. 이러한 효능제는 관련 기술분야에 공지된 것들로부터 선택되는 결합 검정, 예를 들어 문헌 [Rebay *et al.*, *Cell* 67:687-699, 1991] 및 국제 특허 공개 번호 WO 92/19734에 기재된 세포 응집 검정에 의해 확인될 수 있다. (둘 다 본원에 참조로 포함됨).

[0102] 바람직한 실시양태에서 효능제는 적어도 Notch 단백질 또는 Notch의 단편에의 결합을 매개하는 Notch-상호작용 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 단편으로 이루어진 단백질이며, Notch의 단편은 효능제 단백질에의 결합을 담당하는 Notch의 영역, 예를 들어, Notch의 표피 성장 인자-유사 반복부 11 및 12를 함유한다. 본원에 사용된 Notch 상호작용 유전자는 유전자 Notch, 델타, 세레이트, RBPJκ, 헤어리스 서프레서 및 델텍스, 뿐만 아니라 서열 상동성 또는 유전자 상호작용에 의해 확인될 수 있는 델타/세레이트 패밀리 또는 델텍스 패밀리의 다른 구성원 및 보다 일반적으로, 분자 상호작용 (예를 들어, 시험관내 결합, 또는 유전자 상호작용 (예를 들어, 드로소필라에서 표현형적으로 묘사된 바와 같음)에 의해 확인되는 유전자의 "Notch 캐스케이드" 또는 "Notch 군"의 구성원을 의미할 것이다. Notch에의 결합을 담당하는 영역을 함유하는 Notch-결합 단백질의 예시적인 단편은 미국 특허 번호 5,648,464; 5,849,869; 및 5,856,441에 기재되어 있다. (모두 본원에 참조로 포함됨).

[0103] 본원에 기재된 방법에 의해 이용되는 Notch 효능제는 상업적으로 얻어지거나, 재조합 발현에 의해 생산되거나, 화학적으로 합성될 수 있다.

[0104] 구체적인 실시양태에서, Notch 효능제에의 세포의 노출은 세포 표면 상에 Notch 리간드를 재조합적으로 발현하는 다른 세포 (예를 들어, 피더 층)와의 인큐베이션에 의해 수행되지 않고, 오히려 무세포 Notch 리간드에의 노출, 예를 들어, Notch의 무세포 리간드와의 인큐베이션에 의해 수행되며, 리간드는 고체 상의 표면 상에 고정화되며, 예를 들어, 조직 배양 디쉬의 표면 상에 고정화된다.

[0105] 구체적인 실시양태에서, Notch 활성은 Notch 수용체의 세포외 부분에의 Notch 리간드(들) (예를 들어, 델타, 세레이트)의 결합에 의해 촉진된다. Notch 신호전달은 Notch의 세포외 도메인 및 인접한 세포에 막-결합되거나 고체 표면 상에 고정화된 그의 리간드 사이의 물리적 상호작용에 의해 촉발되는 것으로 보인다. 전장 리간드는 Notch의 효능제인데, 이는 하나의 세포 상의 그들의 발현이 Notch 수용체를 발현하는 이웃하는 세포에서의 경로의 활성화를 촉발시키기 때문이다. 고체 표면, 예컨대 조직 배양 플레이트 상에 고정화된 단백질의 세포외 도메인 또는 그의 Notch-결합 부분을 포함하는 가용성 말단절단된 델타 또는 세레이트 분자는 특히 바람직한 Notch 경로 효능제이다. 이러한 가용성 단백질은 항체 또는 상호작용 단백질, 예를 들어 델타 또는 세레이트가 융합 단백질로서 발현되는 에피토프 태그 (예를 들어, 항체 9E10에 의해 인식되는 myc 에피토프 태그)에 대해 지정된 항체 또는 델타 또는 세레이트가 융합 단백질로서 발현되는 에피토프 태그 (예를 들어, 단백질 A에 의해 결합된 이뮤노글로불린 에피토프 태그)와 상호작용하는 단백질에 의해 고체 표면 상에 고정화될 수 있다.

[0106] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 및 아르타바니스-차코나스(Artavanis-Tsakonas) 등의 미국 특허 번호 5,780,300에 기재된 바와 같이, Notch 효능제는 Notch 또는 Notch 신호전달 경로의 구성원의 활성화에 요구되는 성숙 또는 프로세싱 단계를 매개하는 세포 프로세스를 촉진시키거나 활성화시키는 시약, 예컨대 Notch 프로세싱에 요구되는 푸린-유사 컨버타제, 쿠즈바니안(Kuzbanian), Notch의 상류의 또는 평행한 Notch 경로의 활성화에 요구되는 것으로 생각되는 메탈로프로테아제-디스인테그린 (ADAM) (Schlondorff and Blobel, *J. Cell Sci.* 112:3603-3617, 1999), 또는, 보다 일반적으로, 세포 트래피킹 및 프로세싱 단백질, 예컨대 세포 구획 사이의 이동에 요구되는 GTP아제의 rab 패밀리 (Rab GTP아제에 대한 검토를 위해서는, 문헌 [Olkkonen and Stenmark, *Int. Rev. Cytol.* 176:1-185, 1997] 참조)를 포함한다. 효능제는 상기 프로세스 중 하나의 활성을 증가시키는 임의의 분자, 예컨대 푸린, 쿠즈바니안 또는 rab 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 그의 단편 또는 유도체 또는 우

성 활성 돌연변이체, 또는 상기 단백질에 결합하고 그의 기능을 활성화시키는 펩티드모방체 또는 펩티드 유사체 또는 유기 분자일 수 있다.

[0107] 미국 특허 번호 5,780,300은 Notch 경로를 활성화시키는데 사용될 수 있는 Notch 효능제 분자의 부류 (및 그들의 확인 방법), 예를 들어 RBP-Jκ를 갖는 Notch 안키린 반복부의 해리를 촉발시킴으로써 세포질로부터 핵으로의 RBP-Jκ의 전위를 촉진시키는 분자를 추가로 개시하고 있다.

[0108] 일부 바람직한 실시양태에서, DXI를 포함하는 확장 방법이 사용된다. Notch 효능제 DXI는 미국 특허 번호 7,399,633에 기재된 바와 같은 IgG의 Fc 부분에 융합된 단백질의 세포외 도메인으로 이루어진 델타 (델타$^{ext-IgG}$ 또는 DXI)의 고정화된 단편 또는 미국 특허 번호 10,208,286에 기재된 바와 같은 고정화된 Notch-1 또는 Notch-2 특이적 항체이다. 바람직하게는, 델타1$^{ext-IgG}$는 세포 배양 디쉬의 표면 상에 고정화된다. 구체적인 실시양태에서, 세포 배양 디쉬를 4℃에서 밤새 (또는 37℃에서 최소 2시간 동안) 포스페이트 완충 염수 중 2.5 μg/ml 델타1$^{ext-IgG}$ 및 5 μg/ml 레트로넥틴® (rFN-CH-296으로도 지칭되는 재조합 인간 피브로넥틴 단편)으로 코팅한 후, 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포를 첨가한다. 바람직하게는, 세포 배양 배지는 10 ng/ml rhIL-3, 50 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTPO, 50 ng/ml rhFlt-3L, 및 50 ng/ml rhSCF로 보충된 혈청 무함유 조혈 줄기 세포 배양 배지 (예를 들어, 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 또는 스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 II (스템셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티쉬 콜럼비아주 밴쿠버))이다. 조혈 줄기 또는 줄기 및 전구 세포는 이 실시양태에서 7 내지 14일 동안 배양된다.

[0109] 특정 실시양태에서, 풍부화 절차 전의 세포 집단에 비해 확장된 HSPC 중의 세포의 백분율로서의 $CD34^+$ 세포의 수의 증가는 적어도 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 적어도 350배이고, 바람직하게는 100 내지 200배 또는 100 내지 400배이다.

[0110] 확장된 조혈 줄기 세포 또는 줄기 및 전구 세포가 얻어지면, 확장된 줄기 또는 줄기 및 전구 세포 집단 (확장된 HSPC)은 수집되고 동결보존될 수 있거나, NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산하기 위해 제2 상에 직접적으로 사용될 수 있다.

[0111] NK 세포 조성물 및/또는 제제는 프로세스의 제2 상에서의 확장된 HSPC의 분화로부터 초래된다. 분화 상에서, HSPC는 NK 세포로의 HSPC 분화를 유도하고 지정하는데 유효한 소정량의 1종 이상의 시토카인(들)을 함유하는 분화 배양 배지에서 배양된다.

[0112] 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 시토카인은 IL-2 및 IL-15이다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 유일한 시토카인은 IL-2 및 IL-15이다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 IL-2 및 IL-15의 양은 IL-2에 대해 약 25 U/ml 내지 약 100 U/ml 및 IL-15에 대해 약 25 ng/ml 내지 약 50 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지 중의 IL-2 및 IL-15의 양은 IL-2에 대해 약 50 U/ml 및 IL-15에 대해 약 40 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 중의 시토카인은 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 여기서 다른 시토카인, 예컨대 Flt-3L, FGF-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-3, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1α, SCF, IL-21, IL-18, 및 4-1BBL (4-1BB 리간드)은 분화 배양 배지에 첨가되지 않는다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지는 IL-2 및 IL-15 이외의 첨가된 시토카인을 함유하지 않는다.

[0113] 한 실시양태에서, 분화 배양 배지는 보충물, 예컨대, 예를 들어, 인간 혈청 또는 혈장, 또는 폭넓은 스펙트럼의 거대분자를 제공하는 또 다른 단백질성 유체, 지질 물질 및 미량 원소를 위한 담체 단백질, 부착 및 확산 인자, 호르몬, 및 세포 성장 및 건강을 촉진시키는 성장 인자를 추가로 포함한다. 조혈 줄기 세포에 대한 매우 초기 세포 배양 방법에서 소 태아 혈청 (FBS)은 이 세포 배양 보충물로서 사용되었지만; 소 단백질은 인간 제약 생성물에 허용되지 않는다. 따라서, 예를 들어, 인간 혈청, 혈장, 신선한 동결된 혈장, 혈소판 용해물 등을 포함한 다양한 인간 생물학적 유체가 사용되었다. 본 방법의 특정 실시양태에서 인간 AB 혈청이 사용되었다. 특히 바람직한 실시양태에서 혈소판 용해물이 사용되었다. 일부 실시양태에서, 약 2.5 % 내지 약 10 % 인간 혈소판 용해물이 분화 배지에 포함된다. 예를 들어, 분화 배지는 약 3 %, 약 4 %, 약 5 %, 약 6 %, 약 7 %, 약 8 %, 약 9 %, 또는 약 9 % 초과의 인간 혈소판 용해물을 포함할 수 있다. 인간 혈소판 용해물을 포함하는 실시양태에서, 인간 혈소판 용해물은 인간 혈소판으로부터 (예를 들어 혈소판-풍부 혈장 (PRP), 성분채집술을 통해 수집된 만료된 혈소판 등으로부터) 동결 및 해동 사이클 (예를 들어 1 내지 6 사이클), 초음파처리, 용매/세정제 처리, 또는 칼슘 또는 트롬빈으로의 활성화와 같은 (그러나 이에 제한되지는 않음) 프로세스에 의해 생산된다. 인간 혈소판은 자가 수집 및/또는 다수의 상이한 개체로부터의 동종이형 수집으로부터 유래될 수

있다. 인간 혈소판 용해물은 조성 및 생활성에 영향을 미치는 인자, 예컨대 혈장 함량, 성장 인자 함량, 공여자 연령 및 성별, 혈소판 카운트, 생산 프로세스, 헤파린 또는 항응고제 존재, 피브리노겐-고갈, 세포 성분 존재, 대사물 존재, 혈액형, 저장 조건 (예를 들어 지속기간 및/또는 온도), 병원체/바이러스를 감소시키는/불활성화시키는 처리 등 (그러나 이에 제한되지는 않음)과 관련하여 또는 이와 무관하게 사용될 수 있다. (Bieback, K., *et al.*, *Transfusion* 59:3448-3460, 2019). 추가적으로, 인간 혈소판 용해물은 기재된 바와 같은 조성물을 처리한 상업적 공급원으로부터, 또는 상업적으로 허용되는 인간 혈소판 용해물 조성물을 생산하는 임의의 다른 방법에 의해 생산된 허용되는 조성물일 수 있다. 일부 실시양태에서 신선한 동결된 혈장, 또는 약 2.5 % 내지 약 10 % 인간 AB 혈청은 혈소판 용해물 대신 분화 배지에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지는 피더 층 또는 피더 세포를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 분화 배양 배지는 소 태아 혈청 (FBS), 송아지 태아 혈청 (FCS), 및 다른 동물 근원 생성물이 없고, 피더 세포 또는 피더 세포 층을 포함하지 않는다.

[0114] 본원에 개시된 방법은 전형적으로 및 바람직하게는 피더 세포 층을 사용하지 않지만, 이러한 피더 세포 층의 사용은 본원에 기재된 방법의 이점을 변경시키지 않는다. 본원에 사용된 "피더 세포 층", "피더 층", 또는 "피더 세포"는 제2 유형의 세포 (예를 들어, HSPC)와 공동-배양되어 제2 유형의 세포가 유지되고 분화하거나 증식할 수 있는 환경을 제공하는 한 유형의 외인성 세포를 지칭한다. 임의의 이론에 구애되지는 않지만, 피더 세포는 예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드, 전기 신호, 유기 분자, 핵산 분자, 성장 인자, 다른 인자 (예를 들어, 시토카인), 및 대사 영양분을 세포의 제2 유형에 제공할 수 있다.

[0115] 본 방법의 바람직한 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 외인적으로 첨가된 세포, 예컨대 외인성 항원 제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포)를 함유하지 않는다. 본원에 사용된 외인성 세포(들)는 확장된 및/또는 분화된 HSPC로부터 유래되지 않은 세포(들)를 지칭한다.

[0116] HSPC는 시험관내에서 또는 생체외에서 분화 배양 배지에서 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산하는데 충분한 기간 동안 배양된다. 일부 실시양태에서, 분화를 위한 기간은 약 7 내지 21일, 약 7 내지 14일, 약 12 내지 16일, 약 14 내지 16일, 약 7일 또는 약 14일이다. 선택되는 기간은 배양하는 경우 사용되는 온도, 사용되는 시토카인의 농도 및 다른 인자에 의존할 수 있다.

[0117] NK 세포를 분화시키는 상태는 유동 세포계측법 및 항-CD56 항체로 세포를 염색하는 것에 의한 $CD56^+$ 세포의 발달의 결정에 의해 모니터링될 수 있다.

[0118] 생성된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 80 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 20 % 내인성 $CD56^-$ 세포를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 50 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 50 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 55 % 내지 약 65 % $CD56^+$ 세포 및 약 45 % 내지 약 35 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. $CD56^+$ 세포는 우세하게는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 약 70 % 내지 약 85 % $CD56^+$ 세포 및 약 30 % 내지 약 15 % $CD56^-$, 내인성 골수-유래된 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함한다. CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, 및 그랜자임 B; 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a; 저 내지 중간 빈도의 NKG2D를 발현하고; KIR을 실질적으로 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서 $CD56^+$ 세포는 KIR^-이다. (본원에 사용된 "KIR^-"는 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다.) CD16은 저 내지 중간 빈도로 발현된다. 일부 실시양태에서, $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B; 고 빈도의 CD107a, 및 저 빈도의 퍼포린을 발현한다.

[0119] 세포가 분화 배양 배지에서 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 생산하는데 충분한 시간 동안 배양된 후, 집단 중의 생성된 $CD56^+$ (주로 NK) 세포는 전형적으로 인간 신체에서 자연적으로 발견되는 NK 세포를 닮았지만 그와는 별개의 미성숙하지만 기능적인 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제 중의 $CD56^+$ (주로 NK) 세포는 사용 또는 저장 전에 추가로 분화되지 않는다.

[0120] 특정 실시양태에서, 확장 상 동안 IL-15로 NK 세포 분화를 위해 HSPC를 프라이밍하는 것은 최종 NK 세포 조성물 및/또는 제제에서 얻어지는 $CD56^+$ 세포의 수를 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 전형적으로, IL-15는 확장 상의 마지막 약 4 내지 약 7일 동안 첨가된다. 확장 상이 약 7일인 경우, 프라이밍은 마지막 약 4일 동안 일어난다. 이 방법을 사용한 $CD56^+$ 세포의 총 수의 증가는 최대 50 % 또는 그 초과 및 심지어 최대 58 %, 또는 그 초과 증가될 수 있다. 확장 상 및 분화 상의 나머지 단계는 상기 기재된 바와 같이 남아 있다. 이 실시양태에서 IL-15는 약 40 ng/ml 내지 약 100 ng/ml 또는 그 초과의 양으로 첨가될 수 있다.

[0121] 임의의 상기 기재된 방법에 의해 생산된 조성물 및/또는 제제를 포함하는 NK 세포는 관심의 분자 또는 분자들, 예컨대, 예를 들어, 단백질, 핵산, 또는 탄수화물을 발현하도록 유전자 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물 및/또는 제제를 포함하는 NK 세포는 관심의 단백질, 예컨대 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드 (집합적으로 단백질로 지칭됨)를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, 단백질은 항원 인식 수용체, 다른 세포 표면 단백질(들), 또는 세포내 분자이다. 조성물 및/또는 제제의 NK 세포는 확장 상 전에, 또는 동안 및/또는 분화 상 동안 또는 후에 유전자 변형될 수 있다. 전형적인 실시양태에서, NK 세포는 확장 상 동안 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, NK 세포는 분화 상 동안 또는 그에 후속하여 유전자 조작된다.

[0122] 조성물 및/또는 제제를 포함하는 NK 세포는 관심의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체(들)를 발현하도록 유전자 조작될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR)이다. 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 T-세포 수용체 (TCR)이다. 항원 인식 수용체는 예를 들어, 종양 특이적 또는 종양 연관된 항원 또는 병원체 항원에 결합할 수 있다.

[0123] 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원에 결합한다. 임의의 적합한 종양 연관된 또는 종양 특이적 항원 (예를 들어, 항원성 펩티드)은 본원에 기재된 실시양태에 사용될 수 있다. 항원의 공급원은 암 및/또는 백혈병 (예를 들어, AML)과 연관된 단백질 (종양 연관된 또는 종양 특이적 항원)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항원은 펩티드로서 또는 무손상 단백질 또는 그의 부분으로서 발현될 수 있다. 무손상 단백질 또는 그의 부분은 천연 또는 그의 변이체, 예컨대 돌연변이체 형태일 수 있다. 종양 항원의 비-제한적 예는 탄산 안히드라제 IX (CAIX), 암배아 항원 (CEA), CD8, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49c, CD49f, CD56, CD66c, CD73, CD74, CD104, CD133, CD138, CD123, CD142, CD44V6, 시토메갈로바이러스 (CMV) 감염된 세포의 항원 (예를 들어, 세포 표면 항원), 피부 림프구-연관된 항원 (CLA; P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 (PSGL-1)의 특수화된 글리코형), 상피 당단백질-2 (EGP-2), 상피 당단백질-40 (EGP-40), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나제 erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), 폴레이트-결합 단백질 (FBP), 태아 아세틸콜린 수용체 (AChR), 폴레이트 수용체-알파, 강글리오시드 G2 (GD2), 강글리오시드 G3 (GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제 (hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL-13R알파2), 카파-경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체 (KDR), 루이스 Y (LeY), L1 세포 부착 분자 (L1CAM), 흑색종 항원 패밀리 A, 1 (MAGE-A1), 뮤신 16 (MUC16), 뮤신 1 (MUC1), 메소텔린 (MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1, GP100, 프로테이나제3 (PR1), 티로시나제, 수르비빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, 암-고환 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원 (h5T4), 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), ROR1, 테트라스파닌 8 (TSPAN8), 종양-연관된 당단백질 72 (TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2 (VEGF-R2), 윌름스 종양 단백질 (WT-1), 시토카인 수용체-유사 인자 2 (CRLF2), BCMA, GPC3, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, 및 ERBB를 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 종양 항원은 CD19, ROR1, Her2, PSMA, PSCA, 메소텔린 (MSLN), 또는 CD20이다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 백혈병 또는 림프종 상에 발현되는 CD19, CD20, CD33, MSLN, 또는 시토카인 수용체-유사 인자 2 (CRLF2)이다.

[0125] 일부 실시양태에서, 항원은 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 또는 만성 골수성 백혈병 (CML)과 연관되거나 그에 특이적이다. 바람직한 실시양태에서, 표적은 AML과 연관되거나 그에 특이적이다. 바람직한 실시양태에서, 항원은 AML과 연관되거나 그에 특이적이다. 항원은 단백질, 비-단백질, 신항원, 번역후 변형된 항원, 펩티드-MHC 항원, 및/또는 과발현된 항원일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0126] 특정 실시양태에서, AML 특이적 또는 연관된 항원은 AML1-ETO, DEK-CAN, 전골수구성 백혈병-레티노산 수용체 α (PML-RARα), Fms-유사 티로신 키나제 3-내부 일렬 중복 (Flt3-ITD), Fms-유사 티로신 키나제 3 (Flt3), 뉴클레오포스민 1 (NPM1), 오로라(Aurora) A 키나제 (AurA), B-세포 림프종-2 (Bcl-2), Bax 억제제 1 (Bi-1), B 림

프종 Mo-MLV 삽입 영역 1 동족체 (BMI1), BRCA1-연관된 단백질 (BRAP), 만성 골수성 백혈병 (CML) 28 (CML28), CML66, 시클린(Cyclin) B1, 시클린 E, 시토크롬 *P*450 1B1 (CYP1B1), ETO/MTG8 (8q 상의 골수 전위 유전자), 탄산 안히드라제 IX (CAIX), G250/CAIX, 호메오박스 A9 (HOXA9), 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제 (hTERT), 골수 세포 백혈병 서열 1 (Mcl-1), 메소텔린 (MSLN), 부조직적합성 항원 (mHAg) (예를 들어, 림프-제한된 조직적합성 항원 1 (LRH-1)), 미엘로퍼옥시다제, M-상 인단백질 11 (MPP11), 뮤신 1 (MUC1), 핵소체 및 방추체-연관된 단백질 1 (NuSAP1), 종양태아 항원-미성숙 라미닌 수용체 단백질 (OFA/iLRP), 프로테이나제 3, G 단백질 신호전달의 조절제 5 (RGS5), 히알루론산-매개된 운동을 위한 수용체 (RHAMM), 윤활막 육종 X 파단점 2-상호작용 단백질 (SSX2IP), 수르비빈, 윌름스 종양 1 단백질 (WT1), 시클린 A1, 흑색종 항원 (MAGE), Per ARNT Sim 도메인 함유 1 (PASD1), 흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원 (PRAME), 신장 항원-1 (RAGE-1), 열-충격 DnaJ 단백질 동족체 2 (HSJ2), Myc-연관된 아연-핑거 단백질 (MAZ), 신세포암 항원 (NY-REN60), 특히 흥미로운 새로운 Cys-His 단백질 (PINCH), J-κ에 대한 재조합 신호-결합 단백질 1 (RBPJk), 신탁신(Syntaxin), 메틸-리소포스파티드산 (mLPA), α-갈락토실세라마이드 (a-GalCer), 루이스 Y 항원 (LeY), 이소시트레이트 데히드로게나제 1 (IDH1(R132)), 이소시트레이트 데히드로게나제 2 (IDH2(R140)), 뉴클로포스민 1 돌연변이체 ($NPM1^{mut}$), Notch 신호전달 분자 이소형 (Notch 변이체), 히알루로난 수용체 이소형 (CD44v6), 인산화된 펩티드, 단백질 티로신 포스파타제 유형 Iva 구성원 3 (PRL3), 프로테이나제 3 펩티드 HLA-A2-제한된 (PR1/HLA-A2), 20 윌름스 종양 펩티드 HLA-A2-제한된 (WT1/HLA-A2), 인터류킨 12 수용체 베타 1 (IL12RB1), 및/또는 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리의 구성원 (CD96)이다. (Goswami *et al.*, *Curr. Drug Targets* 18:296-303, 2017).

[0127] 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 예를 들어, 면역손상된 대상체에서, 예를 들어, 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환을 치료하고/거나 예방하는데 사용하기 위해 병원체 항원에 결합한다. 특정 실시양태에서, 병원체는 질환을 유발할 수 있는 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 또는 원충을 포함한다.

[0128] 바이러스의 비-제한적 예는 레트로비리다에(Retroviridae) (예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스, 예컨대 HIV-1 및 다른 단리체, 예컨대 HIV-LP; 피코르나비리다에(Picornaviridae) (예를 들어, 폴리오 바이러스, A형 간염 바이러스, 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리다에(Calciviridae) (예를 들어, 위장염을 유발하는 균주); 토가비리다에(Togaviridae) (예를 들어, 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비비리다에(Flaviviridae) (예를 들어, 뎅기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 지카 바이러스); 코로노비리다에(Coronoviridae) (예를 들어, SARS-CoV 및 SARS-CoV-2를 포함한 코로나바이러스); 랍도비리다에(Rhabdoviridae) (예를 들어, 소수포 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리다에(Filoviridae) (예를 들어, 에볼라 바이러스); 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae) (예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae) (예를 들어, 인플루엔자 바이러스); 분가비리다에(Bungaviridae) (예를 들어, 한탄 바이러스, 분가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이라 바이러스); 아레나 비리다에(Arena viridae) (출혈열 바이러스); 레오비리다에(Reoviridae) (예를 들어, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나비리다에(Birnaviridae); 헤파드나비리다에(Hepadnaviridae) (B형 간염 바이러스); 파르보비리다에(Parvoviridae) (파르보바이러스); 파포바비리다에(Papovaviridae) (유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리다에(Adenoviridae) (대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리다에(Herpesviridae) (단순 포진 바이러스 (HSV) 1 및 2, 대상 포진 바이러스, 시토메갈로바이러스 (CMV), 포진 바이러스; 폭스비리다에(Poxviridae) (마마 바이러스, 우두 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리다에(Iridoviridae) (예를 들어, 아프리카 돼지 열 바이러스); 및 비분류된 바이러스 (예를 들어, 델타 간염의 작용제 (B형 간염 바이러스의 결함성 위성체인 것으로 생각됨), 비-A형, 비-B형 간염의 작용제 (부류 1 = 내부 전파됨; 부류 2 = 비경구로 전파됨 (즉, C형 간염); 노르워크 및 관련된 바이러스, 및 아스트로바이러스)를 포함한다.

[0129] 특정 실시양태에서, 병원체 항원은 시토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인 바르 바이러스 (EBV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 단순 포진 바이러스 (HSV1 또는 HSV2), 간염 바이러스 (A, B, 또는 C형), 지카 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 코로나바이러스 (SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2)에 존재하는 바이러스 항원이다. 바람직한 실시양태에서 바이러스 항원은 HIV, HSV 1 또는 2, 지카 바이러스, A, B, 또는 C형 간염, SARS-CoV, 또는 SARS-CoV-2에 특이적이거나 그와 연관된다.

[0130] 박테리아의 비-제한적 예는 파스퇴렐라(*Pasteurella*), 스타필로코쿠스(*Staphylococci*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 및 살모넬라(*Salmonella*) 종을 포함한다. 감염성 박테리아의 구체적인 예는 헬리코박터 필로리스(*Helicobacter pyloris*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophilia*), 미코박테

리아(*Mycobacteria*) 종 (예를 들어, 엠. 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 엠. 아비움(*M. avium*), 엠. 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 엠. 칸사이이(*M. kansaii*), 엠. 고르도나에(*M. gordonae*)), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 네이세리아 고노르호에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닌기티디스(*Neisseria meningitidis*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) (군 A 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) (군 B 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 (비리단스 군), 스트렙토코쿠스 파에칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코쿠스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코쿠스 (혐기성 종), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터(*Campylobacter*) 종, 엔테로코쿠스(*Enterococcus*) 종, 해모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus antracis*), 코리네박테리움 디프테리아스(*Corynebacterium diphtherias*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 종, 에리시펠로트릭스 루시오파티아에(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리디움 페르프린겐스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 파스투렐라 물토시다(*Pasturella multocida*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 종, 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토바실루스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 트레모네마 팔리디움(*Treponema pallidium*), 트레포네마 페르테누에(*Treponema pertenue*), 렙토스피라(*Leptospira*), 리케치아(*Rickettsia*), 및 악티노미세스 이스라엘리(*Actinomyces israelli*)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0131] 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 TCR이다. TCR은 불변 CD3 쇄 분자와의 복합체의 일부로서 발현되는 2개의 가변 쇄로 이루어진 디술피드-연결된 이종이량체성 단백질이다. TCR은 T 세포의 표면 상에 발견되고, 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 펩티드로서 항원을 인식하는 것을 담당한다. 특정 실시양태에서, TCR은 알파 쇄 및 베타 쇄 (각각 TRA 및 TRB에 의해 코딩됨)를 포함한다. 특정 실시양태에서, TCR은 감마 쇄 및 델타 쇄 (각각 TRG 및 TRD에 의해 코딩됨)를 포함한다.

[0132] TCR의 각각의 쇄는 2개의 세포외 도메인으로 구성된다: 가변 (V) 영역 및 불변 (C) 영역. 불변 영역은 세포막에 근위이고, 이어서 막횡단 영역 및 짧은 세포질 꼬리가 이어진다. 가변 영역은 펩티드/MHC 복합체에 결합한다. 둘 다의 쇄의 가변 도메인은 각각 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 갖는다.

[0133] 특정 실시양태에서, TCR은 3개의 이량체성 신호전달 모듈과의 수용체 복합체를 형성할 수 있다: CD3델타/엡실론, CD3감마/엡실론, 및 CD247제타/제타, 또는 제타/에타. TCR 복합체가 그의 항원 및 MHC (펩티드/MHC)와 결속되는 경우, TCR 복합체를 발현하는 T 세포가 활성화된다.

[0134] 특정 실시양태에서, 기재된 조성물 및/또는 제제를 포함하는 NK 세포는 재조합 TCR을 발현하도록 유전자 변형된다. 특정 실시양태에서, TCR은 비-천연 발생 TCR이다. 특정 실시양태에서, TCR은 적어도 1개의 아미노산 잔기에 의해 임의의 천연 발생 TCR과 상이하다. 특정 실시양태에서, TCR은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 초과의 아미노산 잔기에 의해 임의의 천연 발생 TCR과 상이하다. 특정 실시양태에서, TCR은 적어도 1개의 아미노산 잔기에 의해 천연 발생 TCR로부터 변형된다. 특정 실시양태에서, TCR은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 초과의 아미노산 잔기에 의해 천연 발생 TCR로부터 변형된다.

[0135] 일부 실시양태에서, TCR은 시토메갈로바이러스 (CMV), 아데노바이러스, 인간 포진바이러스 6 (HHV6), BK 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스 (EBV), HIV, 또는 SARS (SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2)의 항원에 특이적으로 결합한다.

[0136] 특정 실시양태에서, 항원 인식 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR)이다. CAR은 세포, 예컨대 본원에 기재된 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 세포 상으로 관심의 특이성을 부여하는 조작된 수용체이다. CAR은 본원에 기재된 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 NK 세포 상으로 모노클로날 항체의 특이성을 이식하는데 사용될 수 있으며, 그들의 코딩 서열의 전달은 예를 들어, 레트로바이러스 벡터에 의해 용이하게 된다.

[0137] 이전에 기재된 바와 같은 확장된 HSPC는 이전에 기재된 바와 같이 분화되어 CAR-HSPC 및 CAR-NK 세포를 형성할 수 있다. CAR-HSPC는 CAR 수용체를 발현하도록 조작되고, 조작된 CAR 수용체를 발현하는 HSPC를 포함한다. CAR-NK 세포는 CAR 수용체를 발현하도록 조작되고, 조작된 CAR 수용체를 발현하는 NK 세포를 포함한다.

[0138] CAR의 세대는 하기를 포함한다. "제1 세대" CAR은 전형적으로 T 세포 수용체 쇄의 세포질/세포내 신호전달 도메인에 융합된 막횡단 도메인에 융합된 세포외 항원 결합 도메인 (예를 들어, 단일-쇄 가변 단편 (scFv))으로

구성된다. "제1 세대" CAR은 전형적으로 내인성 TCR로부터의 신호의 1차 전달제인 CD3제타-쇄로부터의 세포내 신호전달 도메인을 갖는다. "제1 세대" CAR은 데 노보 항원 인식을 제공하고, HLA-매개된 항원 제시와 독립적으로 단일 융합 분자에서 그들의 CD3제타 쇄 신호전달 도메인을 통한 세포의 활성화를 유발할 수 있다. "제2 세대" CAR은 다양한 공동-자극성 분자 (예를 들어, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, 또는 2B4)로부터의 세포내 신호전달 도메인을 CAR의 세포질 꼬리에 첨가하여 세포에 추가의 신호를 제공한다. "제2 세대" CAR은 공동-자극 (예를 들어, CD28, 4-1BB 또는 2B4) 및 활성화 (CD3제타) 둘 다를 제공하는 것들을 포함한다. 전임상 연구는 "제2 세대" CAR이 T 세포의 항-종양 활성을 개선시킬 수 있음을 나타내었다. 예를 들어, "제2 세대" CAR 변형된 T 세포의 왕성한 효능은 만성 림프모구성 백혈병 (CLL) 및 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)을 갖는 환자에서 CD19 분자를 표적화하는 임상 시험에서 입증되었다. "제3 세대" CAR은 다중 공동-자극 (예를 들어, CD28 및 4-1BB) 및 활성화 (CD3제타)를 제공하는 것들을 포함한다.

[0139] 일부 실시양태에서, 공동-자극성 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 및/또는 B7-H3 공동자극성 도메인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공동-자극성 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), DAP10, DAP12, ICOS, 및/또는 2B4일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공동-자극성 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB, 2B4, DAP10, DAP12, OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 및/또는 B7-H3 공동자극성 도메인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3제타, CD28 및/또는 4-1BB의 도메인일 수 있다.

[0140] 특정 비-제한적 실시양태에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인 (예를 들어, scFv 또는 그의 유사체로서 구현됨)은 약 2 x10^{-7} M 이하의 해리 상수 (K_d)로 항원에 결합한다. 특정 실시양태에서, K_d는 약 1 x 10^{-7} M 이하, 약 5 x 10^{-8} M 이하, 약 1 x 10^{-8} M 이하, 약 5 x 10^{-9} M 이하, 또는 약 1 x 10^{-9} M 이하이다.

[0141] 항원-표적화된 CAR의 세포외 항원-결합 도메인 (예를 들어, scFv 또는 그의 유사체)의 결합은 예를 들어, 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA), 방사성면역검정 (RIA), FACS 분석, 생물검정 (예를 들어, 성장 억제), 또는 웨스턴 블롯 검정에 의해 확인될 수 있다. 각각의 이들 검정은 일반적으로 관심의 복합체에 대해 특이적인 표지된 시약 (예를 들어, 항체, 또는 scFv)을 채용함으로써 특정 관심의 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, scFv는 방사능 표지되고, 방사성면역검정 (RIA)에 사용될 수 있다 (예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March 1986] 참조). 방사능 동위원소는 감마 카운터 또는 섬광 카운터의 사용과 같은 수단에 의해 또는 방사선촬영술에 의해 검출될 수 있다. 특정 실시양태에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 형광 마커로 표지된다. 형광 마커의 비-제한적 예는 녹색 형광 단백질 (GFP), 청색 형광 단백질 (예를 들어, EBFP, EBFP2, 아주라이트(Azurite), 및 m칼라마1), 시안 형광 단백질 (예를 들어, ECFP, 세룰레안(Cerulean), 및 CyPet), 및 황색 형광 단백질 (예를 들어, YFP, 시트린(Citrine), 비너스(Venus), 및 YPet)을 포함한다.

[0142] CAR은 세포외 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 세포외 항원-결합 도메인은 항원, 예를 들어, 종양 항원 또는 예를 들어 바이러스 또는 박테리아 항원을 포함한 병원체 항원에 특이적으로 결합한다.

[0143] 특정 실시양태에서, 세포외 항원-결합 도메인은 항원에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 세포외 항원-결합 도메인은 scFv이다. 특정 실시양태에서, scFv는 인간 scFv이다. 특정 실시양태에서, scFv는 인간화 scFv이다. 특정 실시양태에서, 세포외 항원-결합 도메인은 임의로 가교된 Fab이다. 특정 실시양태에서, 세포외 결합 도메인은 $F(ab')_2$이다. 특정 실시양태에서, 임의의 상기 분자는 이종 서열과의 융합 단백질에 포함되어 세포외 항원-결합 도메인을 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, scFv는 항원-Fc 융합 단백질을 갖는 scFv 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 확인된다. 특정 실시양태에서, 항원은 종양 항원이다. 특정 실시양태에서, 항원은 예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 항원을 포함한 병원체 항원이다.

[0144] 특정 실시양태에서, 세포외 결합 도메인은 CD19에 특이적으로 결합하는 scFv, 예컨대 FMC63 항체 또는 4G7 항체로부터 유래된 scFv이다. 일부 실시양태에서, scFv는 FMC63 항체의 CDR을 포함한다: RASQDISKYLN (서열식별번호(SEQ ID NO):1)의 CDRL1 서열, SRLHSGV (서열식별번호:2)의 CDRL2 서열, GNTLPYTFG (서열식별번호:3)의 CDRL3 서열, DYGVS (서열식별번호:4)의 CDRH1 서열, VTWGSETTYYNSALKS (서열식별번호:5)의 CDRH2 서열, 및 YAMDYWG (서열식별번호:6)의 CDRH3 서열; 또는 RASQDISKYLN (서열식별번호:1)의 CDRL1 서열, SRLHSGV (서열식별번호:2)의 CDRL2 서열, GNTLPYTFG (서열식별번호:3)의 CDRL3 서열, DYGVS (서열식별번호:4)의 CDRH1 서열,

DNSKSQ (서열식별번호:63)의 CDRH2 서열, 및 YAMDYWG (서열식별번호:6)의 CDRH3 서열. 일부 실시양태에서, 세포외 결합 도메인은 항체 FMC63의 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터 유래되거나 이를 포함하는 scFv이다. 항체 FMC63의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호:64 및 서열식별번호:65에 나타내어진다.

[0145] 서열식별번호:64 FMC63 중쇄 가변 영역

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV
IWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY
[0146] YGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

[0147] 서열식별번호:65 FMC63 경쇄 가변 영역

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH
TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG
[0148] GTKLEIT

[0149] 일부 실시양태에서, scFV는 서열식별번호:25 및 서열식별번호:26 또는 서열식별번호:27에 제시된 바와 같은 CD19 모노클로날 항체 4G7의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합은 서열식별번호:25 및 26, 또는 서열식별번호:25 및 27에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, scFV는 CD19 모노클로날 항체 4G7로부터 유래되고, 바람직하게는 가요성 링커에 의해 함께 연결된 CD19 모노클로날 항체 4G7의 결합 도메인의 일부, CD19 모노클로날 항체 4G7 이뮤노글로불린 감마 1 중쇄 (서열식별번호:25)의 가변 영역의 부분 및 CD19 모노클로날 항체 4G7 이뮤노글로불린 카파 경쇄 (서열식별번호:26 또는 서열식별번호:27)의 가변 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 가요성 링커는 서열식별번호:28에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합은 서열식별번호:25 및 서열식별번호:26에, 또는 서열식별번호:25 및 서열식별번호:27에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0150] 서열식별번호:25 - 항 인간 CD19 모노클로날 항체 4G7 중쇄 가변 영역:

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGY
INPYNDGTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGT
[0151] YYYGSRVFDYWGQGTTLTVSS

[0152] 서열식별번호:26 - 항-인간 CD19 모노클로날 항체 4G7 이뮤노글로불린 카파 경쇄 가변 영역:

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQ
LLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYP
[0153] FTFGAGTKLELKRAD

[0154] 서열식별번호:27 항-인간 CD19 모노클로날 항체 4G7 이뮤노글로불린 카파 경쇄 가변 영역:

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQ
LLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYP
[0155] FTFGAGTKLELKRSDP

[0156] 서열식별번호:28 가요성 링커:

[0157] GGGGSGGGGSGGGGS

[0158] 일부 실시양태에서, scFV는 CLA (피부 림프구 항원) 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30에 제시된 CLA 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:29 및 서열식별번호:30에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0159] 서열식별번호:29 CLA VH (중쇄 가변 영역)

EVQLVESGGGLVQPGNSLKLSCSASGFTFSSYGMHWIRQAPGEGLDWVAY
ISSSSGTVYADAVKARFTISRDNAKNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARAQN
[0160] WDLFDYWGQGVMVTVSS

[0161] 서열식별번호:30 CLA VL (경쇄 가변 영역)

QIMLTQQAESLWISPGERVSITCRASQSLLYTDGKHYLSWYQQKPGQTTK
ALIYHASVRTDGVPTRFIGSGSGTEFTLSIEHVQPEDFAIYYCLQTLKSP
[0162] FTFGSGTKLEIK

[0163] 일부 실시양태에서, scFV는 CD142 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:31 및 32에 제시된 CD142 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조, 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:31 및 서열식별번호:32에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0164] 서열식별번호:31 CD142 VH (중쇄 가변 영역)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLSNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV
IWSGGSTDYNVAFISRLIITKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAIYFCARTTG
[0165] SVFNAMDHWGQGTSVTVSS

[0166] 서열식별번호:32 CD142 VL (경쇄 가변 영역)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPRSSPKPWIYLT
SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAG
[0167] TKLELK

[0168] 일부 실시양태에서, scFV는 CD73 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:33 및 34에 제시된 CD73 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조, 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:33 및 서열식별번호:34에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0169] 서열식별번호:33 CD73 VH (중쇄 가변 영역)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGR
IDPATGNTEYDPKFQGKATITADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCARGY
[0170] YGSSYPPWFAYWGQGTLVTVSA

[0171] 서열식별번호:34 CD73 VL (경쇄 가변 영역)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGSAVAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGA
[0172] GTKLELK

[0173] 일부 실시양태에서, scFV는 CD49c 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:35 및 36에 제시된 CD49c 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:35 및 서열식별번호:36에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0174] 서열식별번호:35 CD49c VH (중쇄 가변 영역)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGR
IDPANGHTKYDPKFQGKATITADTSSNAAYLQLNSLTSEDTAVYYCARRV
[0175] AYAMDYWGQGTSVTVSS

[0176] 서열식별번호:36 CD49c VL (경쇄 가변 영역)

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMHWYQQKSSTSPKLWIYDT
SKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYCCFQGSGYPLTFGGG
[0177] TKLEIK

[0178] 일부 실시양태에서, scFV는 CD66c 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:37 및 38에 제시된 CD66c 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조, 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:37 및 서열식별번호:38에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0179] 서열식별번호:37 CD66c VH (중쇄 가변 영역)

QVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKSLEWL
AHIWWNDERYYNPSLKNQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARS
[0180] PRGYFDYWGHGTTLTVSS

[0181] 서열식별번호:38 CD66c VL (경쇄 가변 영역)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVVTNVAWYQQTPGQSPKALIYS
ASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNVQSGDLAEYFCQQYNSYPLTFGA
[0182] GTKLELK

[0183] 일부 실시양태에서, scFV는 CD104 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:39 및 40에 제시된 CD104 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:39 및 서열식별번호:40에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0184] 서열식별번호:39 CD104 VH (중쇄 가변 영역)

QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYYIFWVKQSHGKSLEWIGY
INPNSGSTNYNEKFKRKATLSVDKSTNTAYMELSRLTSEDSATYYCTRRA
[0185] YYGYNPFDYWGQGVMVTVSS

[0186] 서열식별번호:40 CD104 VL (경쇄 가변 영역)

DIQMTQTPSSMPASLGERVTISCRASRGINNYLSWYQQNLDGTIKPLIYY
TSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSLEPEDFAMYYCQQYDSSPWTFGG
[0187] GTKLELK

[0188] 일부 실시양태에서, scFV는 CD318 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:41 및 서열식별번호:42에 제시된 CD318 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:41 및 서열식별번호:42에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0189] 서열식별번호:41 CD318 VH (중쇄 가변 영역)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGW
IDPENGHTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARLT
GTTYAMDYWGQGTSVTVSS

[0190]

[0191] 서열식별번호:42 CD318 VL (경쇄 가변 영역)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKSGQSPKLLIYW
ASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPYTFGG
GTKLEIK

[0192]

[0193] 일부 실시양태에서, scFV는 TSPAN8 모노클로날 항체로부터 유래되고, 각각 서열식별번호:43 및 44에 제시된 TSPAN8 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호:43 및 서열식별번호:44에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0194] 서열식별번호:43 TSPAN8 VH (중쇄 가변 영역)

EVKLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMNWIRQPAGKAPEWLGF
IRNKASGYTTEYNPSVKGRFTISRDNTQNMLYLQMNTLRAEDTATYYCAR
AHSYYGYDYFDYWGQGVMVTVSS

[0195]

[0196] 서열식별번호:44 TSPAN8 VL (경쇄 가변 영역)

DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPQLLIYG
ATSLADGVPSRFSGSRSGTQYSLKISRLQVEDIRIYYCLQAYSAPWTFGG
GTKLELK

[0197]

[0198] 일부 실시양태에서, CLA에 대한 scFV는 서열식별번호:45 또는 서열식별번호:46에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0199] 서열식별번호:45 CLA 특이적 scFv VH-링커-VL

EVQLVESGGGLVQPGNSLKLSCSASGFTFSSYGMHWIRQAPGEGLDWVAY
ISSSSGTVYADAVKARFTISRDNAKNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARAQN
WDLFDYWGQGVMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIMLTQQAESLWISPGER
VSITCRASQSLLYTDGKHYLSWYQQKPGQTTKALIYHASVRTDGVPTRFI
GSGSGTEFTLSIEHVQPEDFAIYYCLQTLKSPFTFGSGTKLEIK

[0200]

[0201] 서열식별번호:46 CLA 특이적 scFv VL-링커-VH

QIMLTQQAESLWISPGERVSITCRASQSLLYTDGKHYLSWYQQKPGQTTK
ALIYHASVRTDGVPTRFIGSGSGTEFTLSIEHVQPEDFAIYYCLQTLKSP
FTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLKLSCS
ASGFTFSSYGMHWIRQAPGEGLDWVAYISSSSGTVYADAVKARFTISRDN
AKNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARAQNWDLFDYWGQGVMVTVSS

[0202]

[0203] 일부 실시양태에서, CD142에 대한 scFV는 서열식별번호:47 또는 서열식별번호:48에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0204] 서열식별번호:47 CD142 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLSNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV
IWSGGSTDYNVAFISRLIITKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAIYFCARTTG
SVFNAMDHWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPALMSASPG
EKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSNLASGVPARFSGSGS
[0205] GTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

[0206] 서열식별번호:48 CD142 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPRSSPKPWIYLT
SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAG
TKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSL
SNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDYNVAFISRLIITKDNSKSQVF
[0207] LKMNSLQADDTAIYFCARTTGSVFNAMDHWGQGTSVTVSS

[0208] 일부 실시양태에서, CD73에 대한 scFV는 서열식별번호:49 또는 서열식별번호:50에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0209] 서열식별번호:49 CD73 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGR
IDPATGNTEYDPKFQGKATITADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCARGY
YGSSYPPWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMST
SVGDRVSITCKASQDVGSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFT
[0210] GSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK

[0211] 서열식별번호:50 CD73 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGSAVAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGA
GTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFN
IKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPATGNTEYDPKFQGKATITADTSSNT
[0212] AYLHLSSLTSEDTAVYYCARGYYGSSYPPWFAYWGQGTLVTVSA

[0213] 일부 실시양태에서, CD49c에 대한 scFV는 서열식별번호:51 또는 서열식별번호:52에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0214] 서열식별번호:51 CD49c 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGR
IDPANGHTKYDPKFQGKATITADTSSNAAYLQLNSLTSEDTAVYYCARRV
AYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSENVLTQSPAIMSASPGEK
VTMTCSASSSVTYMHWYQQKSSTSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGN
[0215] SYSLTISSMEAEDVATYCCFQGSGYPLTFGGGTKLEIK

[0216] 서열식별번호:52 CD49c 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMHWYQQKSSTSPKLWIYDT
SKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYCCFQGSGYPLTFGGG
TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNI
KDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTKYDPKFQGKATITADTSSNAA
[0217] YLQLNSLTSEDTAVYYCARRVAYAMDYWGQGTSVTVSS

[0218] 일부 실시양태에서, CD66c에 대한 scFV는 서열식별번호:53 또는 서열식별번호:54에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0219] 서열식별번호:53 CD66c 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

QVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKSLEWL
AHIWWNDERYYNPSLKNQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARS
PRGYFDYWGHGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSQKFMSTSVGD
RVSVTCKASQNVVTNVAWYQQTPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFSGSGS
[0220] GTDFTLTISNVQSGDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELK

[0221] 서열식별번호:54 CD66c 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVVTNVAWYQQTPGQSPKALIYS
ASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNVQSGDLAEYFCQQYNSYPLTFGA
GTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFS
LSTSGMGVGWIRQPSGKSLEWLAHIWWNDERYYNPSLKNQLTISKDTSRN
[0222] QVFLKITSVDTADTATYYCARSPRGYFDYWGHGTTLTVSS

[0223] 일부 실시양태에서, CD104에 대한 scFV는 서열식별번호:55 또는 서열식별번호:56에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0224] 서열식별번호:55 CD104 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYYIFWVKQSHGKSLEWIGY
INPNSGSTNYNEKFKRKATLSVDKSTNTAYMELSRLTSEDSATYYCTRRA
YYGYNPFDYWGQGVMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTPSSMPASL
GERVTISCRASRGINNYLSWYQQNLDGTIKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGS
[0225] GSGTDYSLTISSLEPEDFAMYYCQQYDSSPWTFGGGTKLELK

[0226] 서열식별번호:56 CD104 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

DIQMTQTPSSMPASLGERVTISCRASRGINNYLSWYQQNLDGTIKPLIYY
TSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSLEPEDFAMYYCQQYDSSPWTFGG
GTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKASGYT
FTDYYIFWVKQSHGKSLEWIGYINPNSGSTNYNEKFKRKATLSVDKSTNT
[0227] AYMELSRLTSEDSATYYCTRRAYYGYNPFDYWGQGVMVTVSS

[0228] 일부 실시양태에서, CD318에 대한 scFV는 서열식별번호:57 또는 서열식별번호:58에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0229] 서열식별번호:57 CD318 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGW
IDPENGHTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARLT
GTTYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVG
DRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKSGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSG
SGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIK

[0230]

[0231] 서열식별번호:58 CD318 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKSGQSPKLLIYW
ASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPYTFGG
GTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFN
IKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGHTIYDPKFQGKASITADTSSNT
AYLQLSSLTSEDTAVYYCARLTGTTYAMDYWGQGTSVTVSS

[0232]

[0233] 일부 실시양태에서, TSPAN8에 대한 scFV는 서열식별번호:59 또는 서열식별번호:60에 제시된 아미노산 서열을 갖는다 (미국 특허 출원 공개 번호 2019/0209611 참조; 본원에 참조로 포함됨).

[0234] 서열식별번호:59 TSPAN8 특이적 CAR 서열 VH-링커-VL

EVKLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMNWIRQPAGKAPEWLGF
IRNKASGYTTEYNPSVKGRFTISRDNTQNMLYLQMNTLRAEDTATYYCAR
AHSYYGYDYFDYWGQGVMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPASLS
ASLEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPQLLIYGATSLADGVPSRF
SGSRSGTQYSLKISRLQVEDIRIYYCLQAYSAPWTFGGGTKLELK

[0235]

[0236] 서열식별번호:60 TSPAN8 특이적 CAR 서열 VL-링커-VH

DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPQLLIYG
ATSLADGVPSRFSGSRSGTQYSLKISRLQVEDIRIYYCLQAYSAPWTFGG
GTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSEVKLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFT
FTDFYMNWIRQPAGKAPEWLGFIRNKASGYTTEYNPSVKGRFTISRDNTQ
NMLYLQMNTLRAEDTATYYCARAHSYYGYDYFDYWGQGVMVTVSS

[0237]

[0238] CAR의 막횡단 도메인

[0239] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 막의 적어도 부분에 걸치는 소수성 알파 나선을 포함한다. 상이한 막횡단 도메인은 상이한 수용체 안정성을 발생시킨다. 항원 인식 후, 수용체가 클러스터화되고, 신호가 세포에 전달된다. CAR의 막횡단 도메인은 예를 들어, CD8 폴리펩티드, CD28 폴리펩티드, CD3제타 폴리펩티드, CD4 폴리펩티드, 4-1BB 폴리펩티드, OX40 폴리펩티드, ICOS 폴리펩티드, NKG2D 폴리펩티드, 합성 펩티드 (면역 반응과 연관된 단백질에 기반하지 않음), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0240] 특정 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_001139345.1, 서열식별번호:7을 갖는 서열 (본원에서 서열 동일성은 표준 소프트웨어, 예컨대 BLAST 또는 FASTA를 사용하여 결정될 수 있다), 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는다. 본원에 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산이 또 다른 전기적으로 유사한 아미노산에 대해 치환되는 아미노산 치환을 의미한다. 예를 들어, 소수성 측쇄를 갖는 아미노산은 또한 소수성 측쇄를 갖는 상이한 아미노산에 대해 치환될 수 있고 (예를 들어, 이소류신에 대해 치환된 류신, 발린에 대해 치환된 알라닌 등); 산성 쇄를 갖는 아미노산은 또한 산성 측쇄를 갖는 상이한 아미노산에 대해 치환될 수 있고 (예를 들어, 글루탐산에 대해 치환된 아스파르트산 등); 염기성 쇄를 갖는 아미노산은 또한 염기성 측쇄를 갖는 상이한 아미노산에 대해 치환될 수 있고 (예를 들어, 아르기닌에 대해

치환된 리신 등); 극성 측쇄를 갖는 아미노산은 또한 극성 측쇄를 갖는 상이한 아미노산에 대해 치환될 수 있다 (예를 들어, 트레오닌에 대해 치환된 세린 등). 특정 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 235개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:7의 연속적 부분인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 서열식별번호:7의 아미노산 1 내지 235, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 또는 200 내지 235의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 특정 실시양태에서, CAR은 서열식별번호:7의 아미노산 137 내지 209의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD8 폴리펩티드를 포함하는 막횡단 도메인을 포함한다.

[0241] 서열식별번호:7:

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSN
PTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTF
VLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV

[0242]

[0243] 특정 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: AAA92533.1, 서열식별번호:8을 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 60개, 또는 적어도 약 70개, 또는 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 200개, 및 최대 247개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:8의 연속적 부분인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 서열식별번호:8의 아미노산 1 내지 247, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 151 내지 219, 또는 200 내지 247의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 특정 실시양태에서, CAR은 서열식별번호:8의 아미노산 151 내지 219의 아미노산 서열을 포함하는 뮤린 CD8 폴리펩티드를 포함하는 막횡단 도메인을 포함한다.

[0244] 서열식별번호:8:

MASPLTRELSLNLLLMGESIILGSGEAKPQAPELRIFPKKMDAELGQKVD
LVCEVLGSVSQGCSWLFQNSSSKLPQPTFVVYMASSHNKITWDEKLNSSK
LFSAVRDTNNKYVLTLNKFSKENEGYYFCSVISNSVMYFSSVVPVLQKVN
STTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAP
LAGICVAPLLSLIITLICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV

[0245]

[0246] 특정 실시양태에서, CD8 폴리펩티드는 서열식별번호:9에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.

[0247] 서열식별번호:9:

STTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAP
LAGICVALLLSLIITLICY

[0248]

[0249] 특정 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD28 폴리펩티드를 포함한다. CD28 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: P10747 또는 NP_006130 (서열식별번호:10)을 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 비-제한적 특정 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 220개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:10의 연속적 부분인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 서열식별번호:10의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 114 내지 220, 150 내지 200, 또는 200 내지 220의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본 개시된 CAR의 막횡단 도메인에 포함된 CD28 폴리펩티드는 서열식별번호:10의 아미노산 153 내지 179의 아미노산 서열을 갖는다.

[0250] 서열식별번호:10:

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSRE
FRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQ
NLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPS
KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG
[0251] PTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0252] 특정 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 NKG2D 폴리펩티드를 포함한다. NKG2D 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_0031386.2 (서열식별번호:66)를 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 비-제한적 특정 실시양태에서, NKG2D 폴리펩티드는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 216개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:66의 연속적 부분인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, NKG2D 폴리펩티드는 서열식별번호:10 (예를 들어, 아미노산 52 내지 72)의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0253] 서열식별번호:66:

MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENA
SPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCP
KNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVK
SYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYI
[0254] ENCSTPNTYICMQRTV

[0255] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD3제타 (CD3ζ) 폴리펩티드를 포함한다. CD3제타 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 NCBI 참조 번호: NP_932170 (서열식별번호:11), 서열식별번호:12, 또는 서열식별번호:13에 제시된 CD3제타의 막횡단 도메인의 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0256] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD4 폴리펩티드를 포함한다. CD4 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 NCBI 참조 번호: NP_000607.1, NP_001181943.1 또는 NP_001181946.1 (각각 본원에 참조로 포함됨)에 제시된 CD4의 막횡단 도메인의 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 4-1BB 폴리펩티드를 포함한다. 4-1BB 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 NCBI 참조 번호: P41273 (본원에 참조로 포함됨) 또는 NP_001552.2 (서열식별번호:18)에 제시된 4-1BB의 막횡단 도메인의 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0258] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 OX40 폴리펩티드를 포함한다. OX40 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 NCBI 참조 번호: NP_003318.1 (본원에 참조로 포함됨)에 제시된 OX40의 막횡단 도메인의 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 ICOS 폴리펩티드를 포함한다. ICOS 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 NCBI 참조 번호: NP_036224.1 (본원에 참조로 포함됨)에 제시된 ICOS의 막횡단 도메인의 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0260] 스페이서 영역

[0261] 특정 비-제한적 실시양태에서, CAR은 또한 세포외 항원-결합 도메인을 막횡단 도메인에 연결하는 스페이서 영역

을 포함할 수 있다. 스페이서 영역은 항원 결합 도메인이 항원 인식을 용이하게 하는 상이한 방향에서 배향되는 것을 허용하는데 충분한 가요성일 수 있다. 스페이서 영역은 IgG_1로부터의 힌지 영역 (진펩트(GenPept) 참조 번호: P01857.1, 본원에 참조로 포함됨), 또는 이뮤노글로불린의 CH_2CH_3 영역 (예를 들어, IgG_4 (진펩트 참조 번호: P01861.1, 본원에 참조로 포함됨) 및 CD3의 부분, CD28 폴리펩티드의 부분 (예를 들어, 서열식별번호:10의 부분), CD8 폴리펩티드의 부분 (예를 들어, 서열식별번호:7의 부분, 또는 서열식별번호:8의 부분), 그와 적어도 약 80 %, 적어도 약 85 %, 적어도 약 90 %, 또는 적어도 약 95 % 동일한 임의의 상기의 변이체, 또는 합성 스페이서 서열일 수 있다.

[0262] CAR의 세포내 신호전달 도메인

[0263] 특정 비-제한적 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 세포 (예를 들어, 림프 계통의 세포, 예를 들어, NK 세포)를 활성화시키거나 자극시킬 수 있는 CD3제타 (CD3ζ) 폴리펩티드를 포함할 수 있다. CD3ζ는 3개의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하고, 항원이 결합된 후 활성화 신호를 세포 (예를 들어, 림프 계통의 세포, 예를 들어, NK 세포)에 전달한다. 특정 실시양태에서, CD3제타 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_932170 (서열식별번호:11)을 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는다. 특정 비-제한적 실시양태에서, CD3ζ 폴리펩티드는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 164개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:11의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD3제타 폴리펩티드는 서열식별번호:11의 아미노산 1 내지 164, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 또는 150 내지 164의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 특정 실시양태에서, CD3ζ 폴리펩티드는 서열식별번호:11의 아미노산 52 내지 164의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.

[0264] 서열식별번호:11:

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALF
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
[0265] DTYDALHMQALPPR

[0266] 특정 실시양태에서, CD3제타 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_001106864.2 (서열식별번호:12)를 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는다. 특정 비-제한적 실시양태에서, CD3제타 폴리펩티드는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 90개, 또는 적어도 약 100개, 및 최대 188개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:12의 연속적 부분인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD3ζ 폴리펩티드는 서열식별번호:12의 아미노산 1 내지 164, 1 내지 50, 50 내지 100, 52 내지 142, 100 내지 150, 또는 150 내지 188의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 특정 실시양태에서, CD3제타 폴리펩티드는 서열식별번호:12의 아미노산 52 내지 142의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.

[0267] 서열식별번호:12:

MKWKVSVLACILHVRFPGAEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVIITALY
LRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQ
RRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQDSHFQAVQ
[0268] FGNRREREGSELTRTLGLRARPKACRHKKPLSLPAAVS

[0269] 특정 실시양태에서, CD3제타 폴리펩티드는 서열식별번호:13에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다.

[0270] 서열식별번호:13:

RAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQQ
RRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
TYDALHMQTLAPR

[0271]

[0272] 특정 비-제한적 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 공동-자극성 신호전달 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 공동-자극성 영역은 최적 림프구 활성화를 제공할 수 있는 적어도 1개의 공동-자극성 분자를 포함한다. 본원에 사용된 "공동-자극성 분자"는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 그들의 리간드 이외의 세포 표면 분자를 지칭한다. 적어도 1개의 공동-자극성 신호전달 영역은 예를 들어, CD28 폴리펩티드, 4-1BB 폴리펩티드, OX40 폴리펩티드, ICOS 폴리펩티드, DAP-10 폴리펩티드, DAP-12 폴리펩티드, 2B4 폴리펩티드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 공동-자극성 분자는 그의 수용체에의 결합시 공동-자극성 반응, 즉, 항원이 그의 CAR 분자에 결합하는 경우 제공되는 자극을 실행하는 세포내 반응을 생성하는 세포 표면 상에 발현되는 단백질인 공동-자극성 리간드에 결합할 수 있다. 공동-자극성 리간드는 CD80, CD86, CD70, OX40L, 및 4-1BBL을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 예로서, 4-1BB 리간드 (즉, 4-1BBL)는 CAR 신호와 조합으로 NK 세포의 이펙터 세포 기능을 유도하는 세포내 신호를 제공하기 위해 4-1BB ("CD137"로도 공지됨)에 결합할 수 있다. 4-1BB, ICOS 또는 DAP-10을 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,446,190에 개시되어 있으며 (즉, 4-1BB를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호:15에 제시되고, 단백질 서열은 NP_001551.2에 제시되고; ICOS를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호:16에 제시되고, 단백질 서열은 NP_036224.1에 제시되고, DAP-10을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호:17에 제시되고, 단백질 서열은 NP_055081.1에 제시된다), 미국 특허 번호 7,446,190 및 참조 단백질 서열은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0273] 서열식별번호:15 - 4-1BB

ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGTTGCTGGTCCTCAA
CTTTGAGAGGACAAGATCATTGCAGGATCCTTGTAGTAACTGCCCAGCTG
GTACATTCTGTGATAATAACAGGAATCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCA
AATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCA
GTGTAAAGGTGTTTTCAGGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATG
CAGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGGGGCAGGATGCAGC
ATGTGTGAACGGATTGTAAACAAGGTCAAGAACTGACAAAAAAAGGTTG
TAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGCATCTGTC
GACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGG
ACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCC
GGGAGCATCCTCTGTGACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACT
CTCCGCAGATCATCTCCTTCTTTCTTGCGCTGACGTCGACTGCGTTGCTC
TTCCTGCTGTTCTTCCTCACGCTCCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAG
AAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA
CTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA
GGAGGATGTGAACTGTGA

[0274]

[0275] 서열식별번호: 16 - ICOS

ATGAAGTCAGGCCTCTGGTATTTCTTTCTCTTCTGCTTGCGCATTAAAGT
TTTAACAGGAGAAATCAATGGTTCTGCCAATTATGAGATGTTTATATTTC
ACAACGGAGGTGTACAAATTTTATGCAAATATCCTGACATTGTCCAGCAA
TTTAAAATGCAGTTGCTGAAAAGGGGGGCAAATACTCTGCGATCTCACTAA
GACAAAAGGAAGTGGAAACACAGTGTCCATTAAGAGTCTGAAATTCTGCC
ATTCTCAGTTATCCAACAACAGTGTCTCTTTTTTTCTACAACCTTGGAC
CATTCTCATGCCAACTATTACTTCTGCAACCTATCAATTTTTGATCCTCC
TCCTTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCATATTTATGAAATCAC
AACTTTGTTGCCAGCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTT
GTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAA
GAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGA

[0276] GAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTATAA

[0277] 서열식별번호:17 - DAP-10

ATGATCCATCTGGGTCACATCCTCTTCCTGCTTTTGCTCCCAGTGGCTGC
AGCTCAGACGACCCCAGGAGAGAGATCATCACTCCCTGCCTTTTACCCTG
GCACTTCAGGCTCCTGTTCCGGATGTGGGTCCCTCTCTCTGCCGCTCCTG
GCAGGCCTCGTGGCTGCTGATGCGGTGGCATCGCTGCTCATCGTGGGGGC
GGTGTTCCTGTGCGCACGCCCACGCCGCAGCCCCGCCCAAGAAGATGGCA

[0278] AAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCTGA

[0279] 특정 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함한다. CD28 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: P10747 (본원에 참조로 포함됨) 또는 NP_006130 (서열식별번호:10)을 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 비-제한적 특정 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 220개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:10의 연속적 부분인 아미노산 서열을 갖는다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 서열식별번호:10의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 114 내지 220, 150 내지 200, 또는 200 내지 220의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열식별번호:10의 아미노산 180 내지 220의 아미노산 서열을 갖는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함한다.

[0280] 특정 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_031668.3 (서열식별번호:14)을 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는다. 비-제한적 특정 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 및 최대 218개의 아미노산의 길이인 서열식별번호:14의 연속적 부분인 아미노산 서열을 갖는다. 대안적으로 또는 추가적으로, 비-제한적 다양한 실시양태에서, CD28 폴리펩티드는 서열식별번호:14의 아미노산 1 내지 218, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 114 내지 220, 150 내지 200, 178 내지 218, 또는 200 내지 220의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본 개시된 CAR의 공동-자극성 신호전달 영역은 서열식별번호:14의 아미노산 178 내지 218을 포함하거나 갖는 CD28 폴리펩티드를 포함한다.

[0281] 서열식별번호:14:

MTLRLLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLLVVDSNEVSLSCRYSYNLLAK
EFRASLYKGVNSDVEVCVGNGNFTYQPQFRSNAEFNCDGDFDNETVTFRL
WNLHVNHTDIYFCKIEFMYPPPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKL
FWALVVVAGVLFCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRLLQSDYMNMTPRRPGLT
[0282] RKPYQPYAPARDFAAYRP

[0283] 특정 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 2개의 공동-자극성 분자를 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함한다: CD28 및 4-1BB 또는 CD28 및 OX40.

[0284] 4-1BB는 종양 괴사 인자 (TNF) 리간드로서 작용할 수 있고, 자극 활성을 갖는다. 4-1BB 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: P41273 (본원에 참조로 포함됨) 또는 NP_001552.2 (서열식별번호:18)에 제시된 서열 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0285] 서열식별번호:18:

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPP
NSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS
MCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNG
TKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALL
[0286] FLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0287] OX40 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: P43489 (본원에 참조로 포함됨) 또는 NP_003318.1 (서열식별번호:19)을 갖는 서열, 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0288] 서열식별번호:19:

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGN
GMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCT
ATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLA
GKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQ
GPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDA
[0289] HKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

[0290] ICOS 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_036224.1 (서열식별번호:20)을 갖는 서열 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0291] 서열식별번호:20:

MKSGLWYFFLFCLRIKVLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQ
FKMQLLKGGQILCDLIKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLD
HSHANYYFCNLSIFDPPPFKVTLIGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAF
[0292] VVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL

[0293] DAP-12 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_003323.1, NP_001166986.1, NP_001166985.1 또는 NP_937758.1 (각각 본원에 참조로 포함됨)을 갖는 서열 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노

산 치환을 가질 수 있는 공동-자극성 영역의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0294] 2B4 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_057466.1, NP_001160135.1 또는 NP_001160136.1 (각각 본원에 참조로 포함됨)을 갖는 서열 또는 그의 단편과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하고/거나 임의로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 공동-자극성 영역의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0295] 추가의 유전자

[0296] 일부 실시양태에서, CAR 구축물은 추가의 유전자 생성물, 예컨대 시토카인 또는 형질감염 마커를 코딩하는 유전자(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 유전자는 시토카인, 예컨대 인간 IL-15 (미국 특허 번호 9,931,377; 서열식별번호:68), IL-18 또는 IL-12를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 추가의 유전자는 형질감염 마커 또는 자살 유전자, 예컨대 말단절단된 EGFR (tEGFR) (WO2011/056894 참조; 서열식별번호:67) 또는 iCaps9 (WO2013/040371)를 코딩하며, 그의 서열은 본원에 참조로 포함된다.

[0297] 서열식별번호:67 - tEGFR

RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQE
LDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSL
GL
RSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVC
HA
LCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECL
PQ
AMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVC
HLC
[0298] HPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

[0299] 서열식별번호:68 - IL-15

RISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLK
KIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILA
NN
[0300] SLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0301] 예시적인 CAR 구축물

[0302] 특정 실시양태에서, CAR은 CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, CD28 폴리펩티드를 포함하는 막횡단 도메인, 및 CD3제타 폴리펩티드를 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, CAR은 1928z로 명명된다. 특정 실시양태에서, 1928z는 서열식별번호:21에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일한 단백질이다. 단백질 서열은 아미노산 1 내지 18에서의 CD8 리더 서열을 포함하고, 인간 CD19에 결합할 수 있다.

[0303] 서열식별번호:21

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSY
WMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQ
LSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPK
PLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYP
YTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFP
GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR
RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0304]

[0305] 또 다른 실시양태에서, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서, CD28 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극성 신호전달 영역, 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR이 제공된다. 특정 실시양태에서, CAR은 1928z1로 명명된다. 특정 실시양태에서, 1928z1은 서열식별번호:22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일성을 갖는 단백질이다.

[0306] 서열식별번호:22

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LP
YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
VS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN
SL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLV
V
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DA
LHMQALPPRL

[0307]

[0308] 특정 실시양태에서, CAR은 MUC16에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, CD28 폴리펩티드를 포함하는 막횡단 도메인, 및 CD3제타 폴리펩티드를 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, CAR은 4H1128z로 명명된다. 특정 실시양태에서, 4H1128z은 서열식별번호:23에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일성을 갖는 단백질이다. 단백질은 아미노산 1 내지 18에서의 CD8 리더 서열을 포함하고, MUC-16 엑토도메인에 결합한다.

[0309] 서열식별번호:23

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQESGGGFVKPGGSLKVSCAASGFTFSSY
AMSWVRLSPEMRLEWVATISSAGGYIFYSDSVQGRFTISRDNAKNTLHLQ
MGSLRSGDTAMYYCARQGFGNYGDYYAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIELTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNQLAWYQQ
KPGQSPELLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC
QQSYNLLTFGPGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLC
PSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY
MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0310]

[0311] 특정 실시양태에서, CAR은 CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, CD8 폴리펩티드를 포함하는 막횡단 도메인, 및 CD3제타 폴리펩티드를 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, CAR은 19BBz이다. 19BBz 폴리펩티드의 예시적인 단백질 서열은 서열식별번호:24에 제시된다.

[0312] 서열식별번호:24:

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNW
V
KQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDS
AV
YFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKF
MS
TSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSG
SG
TDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTPAPRPPTPA
PT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN
KR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAEPPAYQQ
GQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0313]

[0314] 특정 실시양태에서, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서, CD28 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극성 신호전달 영역, 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR이 제공된다. 또한 자기-절단 2A 펩티드에 의해 CAR의 카르복시 말단 부분에 부착된 말단절단된 EGFR (tEGFR) 폴리펩티드를 포함하는 예시적인 CD19 CAR 단백질 서열은 서열식별번호:61에 제시된다.

[0315] 서열식별번호:61:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LP
YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
VS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN
SL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLV
V
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DA
LHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPR
K
VCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD
IL
KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRS
LK
EISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALC
SP
EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQA
MNI
TCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHP
NC
[0316] TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

[0317] 특정 실시양태에서, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서, CD28 막횡단 도메인의 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극성 신호전달 영역, 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR이 제공된다. 또한 자기-절단 2A 펩티드에 의해 CAR의 카르복시 말단 부분에 부착된 인간 IL-15를 포함하는 예시적인 CD19 CAR 단백질 서열은 서열식별번호:62에 제시된다.

[0318] 서열식별번호:62:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LP
YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
VS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN
SL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLV
V
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DA
LHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNS
HF
LTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP
SC
KVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL
EE
KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0319]

[0320] 서열식별번호:62에서의 구축물을 코딩하는 상응하는 핵산 서열은 서열식별번호:69에 제시된다.

[0321] 서열식별번호:69:

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTT
TC

[0322]

TGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAG
CC
TGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTA
CC
TGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCA
CA
CCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGG
CA
CCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTA
CT
TTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCT
GG
AAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCA
GC
ACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCC
AG
CCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTAC
GG
CGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTG
AT
CTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACC
AT
CATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAG
A
CCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAG
CT
ACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATC
TA
AGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTC
GG
AGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTT
GG

[0323]

GTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
GA
CCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
AA
GAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCC
CC
TGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGA
AG
GGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGG
CG
GCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGA
AA
GACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGG
CG
GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGAT
AC
CTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGCTCGAGGGCGGCGGA
GA
GGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT
AG
GATGCGGATTTCCAAACCTCACCTGCGCTCTATCTCTATCCAGTGCTATCTGT
GC
CTGCTGCTGAACTCACATTTCCTGACCGAAGCCGGCATCCACGTGTTCATCCT
GG
GCTGCTTTTCCGCCGGCCTGCCAAAGACCGAGGCAAACTGGGTGAATGTGAT
CT
CTGACCTGAAGAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCAC
CC
TGTACACAGAGTCCGATGTGCACCCTTCTTGCAAGGTGACAGCCATGAAGTG
TTT
CCTGCTGGAGCTGCAGGTCATCAGCCTGGAGAGCGGCGACGCCTCTATCCAC
GA

[0324]

TACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAACGGC
AA
TGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATAT
CA
AAGAGTTCCTGCAGTCATTCGTCCATATCGTCCAGATGTTTATCAATACCTCC
TA
A

[0325]

[0326] 특정 실시양태에서, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서, CD28 막횡단 도메인의 막횡단 도메인, 2B4 공동-자극성 신호전달 영역, 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR이 제공된다. 또한 자기-절단 2A 펩티드에 의해 CAR의 카르복시 말단 부분에 부착된 인간 IL-15를 포함하는 예시적인 CD19 CAR 단백질 서열은 서열식별번호:70에 제시된다.

[0327] 서열식별번호:70:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LP
YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
VS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN
SL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLV
V
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHE
QE
QTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEV
IG
KSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GH

[0328]

DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMRIS
KP
HLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLI
QS
MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSL
SS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0329]

[0330] 서열식별번호:70 구축물을 코딩하는 상응하는 핵산 서열은 서열식별번호:71에 제시된다.

[0331] 서열식별번호:71:

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTT
TC
TGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAG
CC
TGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTA
CC
TGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCA
CA
CCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGG
CA
CCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTA
CT
TTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCT
GG
AAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCA
GC
ACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCC
AG
CCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTAC
GG
CGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTG
AT

[0332]

CTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACC
AT
CATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAG
A
CCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAG
CT
ACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATC
TA
AGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTC
GG
AGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTT
GG
GTGTGGAGGAGGAAGAGGAAGGAGAAGCAGAGCGAGACAAGCCCTAAGGA
GTT
TCTGACAATCTATGAAGACGTGAAGGACCTGAAGACACGGAGAAACCACGA
GC
AGGAGCAGACCTTCCCTGGAGGAGGCAGCACAATCTACTCCATGATCCAGTC
TC
AGAGCAGCGCCCCCACCTCCCAGGAGCCTGCCTACACACTGTATAGCCTGAT
CC
AGCCATCCCGGAAGTCTGGCAGCAGGAAGCGCAACCACTCCCCCTCTTTTAA
TTC
TACCATCTATGAAGTGATCGGCAAGAGCCAGCCCAAGGCACAGAACCCCGCA
CG
ACTGAGCAGGAAGGAACTGGAGAACTTTGATGTCTACTCTAGGGTGAAGTTC
AG
CAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAAC
GA
GCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGG
CC
GGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCC
TG

[0333]

TATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGC
AT
GAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCT
GT
CCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCC
AA
GGCTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACG
TG
GAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGCGGATTTCCAAACCTCACCTGCGCTCTA
TCT
CTATCCAGTGCTATCTGTGCCTGCTGCTGAACTCACATTTCCTGACCGAAGCC
GG
CATCCACGTGTTCATCCTGGGCTGCTTTTCCGCCGGCCTGCCAAAGACCGAGG
CA
AACTGGGTGAATGTGATCTCTGACCTGAAGAAGATCGAGGATCTGATCCAGA
GC
ATGCACATCGACGCCACCCTGTACACAGAGTCCGATGTGCACCCTTCTTGCAA
G
GTGACAGCCATGAAGTGTTTCCTGCTGGAGCTGCAGGTCATCAGCCTGGAGA
GC
GGCGACGCCTCTATCCACGATACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACA
AT
AGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGTGAG
GA
GCTGGAGGAGAAGAATATCAAAGAGTTCCTGCAGTCATTCGTCCATATCGTC
CA
GATGTTTATCAATACCTCCTAA

[0334]

[0335] 특정 실시양태에서, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서, NKG2D 막횡단 도메인의 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극성 신호전달 영역, 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR이 제공된다. NKG2D 막횡단 도메인의 사용은 이전에 사용되었지만 (Xu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 12:49, 2019), 일부는 NKGD2가 유형 II 막 단백질이기 때문에 이는 반대 배향에서 삽입되어야 함을 시사한다. 또한 자기-절단 2A 펩티드에 의해 CAR의 카르복시 말단 부분에 부착된 인간 IL-15를 포함하는 예시적인 CD19 CAR 단백질 서열은 서열식별번호:72에 제시된다.

[0336] 서열식별번호:72:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LP
YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
VS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN
SL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPPFFFCCFI
A
VAMGIRFIIMVTKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR
VKF
SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
RLE
GGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI
LG
CFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFL
LE
LQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSF
VHI
VQMFINTS

[0337]

[0338] 서열식별번호:72 구축물을 코딩하는 상응하는 핵산 서열은 서열식별번호:73에 제시된다.

[0339] 서열식별번호:73:

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTT
TC

[0340]

TGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAG
CC
TGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTA
CC
TGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCA
CA
CCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGG
CA
CCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTA
CT
TTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCT
GG
AAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCA
GC
ACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCC
AG
CCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTAC
GG
CGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTG
AT
CTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACC
AT
CATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAG
A
CCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAG
CT
ACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATC
TA
AGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTCCCTTCTTTTTCTGCTGTTTTATCG
CC
GTGGCTATGGGCATCCGGTTCATCATCATGGTGACCAAACGGGGCAGAAAGA
AA

[0341]

CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGA
G
GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA
CT
GAGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAG
A
ATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCT
G
GATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAG
AA
CCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC
CT
ACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACG
GC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACA
TG
CAGGCCCTGCCCCCAAGGCTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTT
CT
AACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGCGGATTTCCAAA
CC
TCACCTGCGCTCTATCTCTATCCAGTGCTATCTGTGCCTGCTGCTGAACTCACA
TT
TCCTGACCGAAGCCGGCATCCACGTGTTCATCCTGGGCTGCTTTTCCGCCGGC
CT
GCCAAAGACCGAGGCAAACTGGGTGAATGTGATCTCTGACCTGAAGAAGATC
GA
GGATCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACAGAGTCCGAT
GT
GCACCCTTCTTGCAAGGTGACAGCCATGAAGTGTTTCCTGCTGGAGCTGCAGG
TC
ATCAGCCTGGAGAGCGGCGACGCCTCTATCCACGATACCGTGGAGAACCTGA
TC

[0342]

ATCCTGGCCAACAATAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACAGAGTCCGGCT
GC
AAGGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATATCAAAGAGTTCCTGCAGTCA
TTC
GTCCATATCGTCCAGATGTTTATCAATACCTCCTAA

[0343]

[0344] 특정 실시양태에서, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인, 인간 IgG_4로부터의 힌지 스페이서, NKG2D 막횡단 도메인의 막횡단 도메인, 2B4 공동-자극성 신호전달 영역, 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인을 갖는 CAR이 제공된다. 또한 자기-절단 2A 펩티드에 의해 CAR의 카르복시 말단 부분에 부착된 인간 IL-15를 포함하는 예시적인 CD19 CAR 단백질 서열은 서열식별번호:74에 제시된다.

[0345] 서열식별번호:74:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LP
YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
VS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN
SL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPPFFFCCFI
A
VAMGIRFIIMVTWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGG
STI
YSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQ
NP
ARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LS
TATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMRISKPHLRSISI
QC

[0346] YLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
TL
YTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVT
ES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0347]

[0348] 서열식별번호:74 구축물을 코딩하는 상응하는 핵산 서열은 서열식별번호:75에 제시된다.

[0349] 서열식별번호:75:

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTT
TCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCC
AGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCA
AGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGAT
CTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGC
GGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATA
TCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGC
GGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGC
AGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCT
GGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCG
TGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCAGGAAGGG
CCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGC
GCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGT
TCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGC
CAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC
ACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTT
GCCCTCCCTTCTTTTTCTGCTGTTTTATCGCCGTGGCTATGGGCATCCGGTTCA
TCATCATGGTGACCTGGAGGAGGAAGAGGAAGGAGAAGCAGAGCGAGACAA
GCCCTAAGGAGTTTCTGACAATCTATGAAGACGTGAAGGACCTGAAGACACG
GAGAAACCACGAGCAGGAGCAGACCTTCCCTGGAGGAGGCAGCACAATCTA
CTCCATGATCCAGTCTCAGAGCAGCGCCCCCACCTCCCAGGAGCCTGCCTACA
CACTGTATAGCCTGATCCAGCCATCCCGGAAGTCTGGCAGCAGGAAGCGCAA
CCACTCCCCCTCTTTTAATTCTACCATCTATGAAGTGATCGGCAAGAGCCAGC
CCAAGGCACAGAACCCCGCACGACTGAGCAGGAAGGAACTGGAGAACTTTG
ATGTCTACTCTAGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCA

[0350]

GCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGA
GTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAA
GCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGA
CAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCG
GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGAT
ACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGCTCGAGGGCGGCG
GAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCG
GCCCTAGGATGCGGATTTCCAAACCTCACCTGCGCTCTATCTCTATCCAGTGC
TATCTGTGCCTGCTGCTGAACTCACATTTCCTGACCGAAGCCGGCATCCACGT
GTTCATCCTGGGCTGCTTTTCCGCCGGCCTGCCAAAGACCGAGGCAAACTGG
GTGAATGTGATCTCTGACCTGAAGAAGATCGAGGATCTGATCCAGAGCATGC
ACATCGACGCCACCCTGTACACAGAGTCCGATGTGCACCCTTCTTGCAAGGTG
ACAGCCATGAAGTGTTTCCTGCTGGAGCTGCAGGTCATCAGCCTGGAGAGCG
GCGACGCCTCTATCCACGATACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAA
TAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGTGAG
GAGCTGGAGGAGAAGAATATCAAAGAGTTCCTGCAGTCATTCGTCCATATCG
TCCAGATGTTTATCAATACCTCCTAA

[0351]

[0352] 발현 구축물

[0353] 특정 실시양태에서, CAR은 인간 세포에서 핵산 서열을 발현시키기 위한 유도성 프로모터를 포함하는 핵산으로부터 추가로 발현될 수 있다. CAR 유전자를 발현시키는데 사용하기 위한 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 유비퀴틴 C (UbiC), PGK, EF-1알파, MND (골수증식성 육종 바이러스 인핸서를 갖는 변형된 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 긴 말단 반복부의 U3 영역을 함유하는 합성 바이러스 프로모터), 또는 닭 베타 액틴에 대한 프로모터일 수 있다.

[0354] 면역치료를 위한 유전자 변형된 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 제조하는 방법은 $CD56^+$ (주로 NK) 세포 내로 항원 인식 수용체(들), 예컨대 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)를 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 목적하는 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)는 확장 전에, 동안, 또는 후에 HSPC 내로, 또는 분화 전에, 동안, 또는 후에 HSPC 또는 NK 세포 조성물 및/또는 제제 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태는 HSPC 또는 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 CAR, TCR, 또는 다른 항원 인식 수용체를 코딩하는 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드로 형질전환시키거나, 형질도입시키거나, 또는 형질감염시키고, 폴리뉴클레오티드를 세포에서 발현시킴으로써 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 조작하는 방법에 관한 것이다. 목적하는 폴리뉴클레오티드 코딩 유전자는 형질감염, 전기천공, 미세주사, 리포펙션, 인산칼슘 매개된 형질감염, 유전자 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터로의 감염, 세포 융합, 염색체-매개된 유전자 전달, 미세세포-매개된 유전자 전달, 스페로플라스트 융합, CRISPR 또는 다른 희귀-커팅 엔도뉴클레아제 (예를 들어, TALE-뉴클레아제 또는 Cas9 엔도뉴클레아제)를 사용하는 것 등을 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 HSPC 또는 다른 세포 내로 도입될 수 있다. 세포 내로의 외래 유전자의 도입을 위한 다수의 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있으며 (예를 들어, 문헌 [Loeffler and Behr, *Meth. Enzymol.* 217:599-618, 1993]; [Cohen *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:618-644, 1993]; [Cline, *Pharmac. Ther.* 29:69-92, 1985] 참조), 수용자 세포의 필수적인 생리학적 기능이 파괴되지 않는 한, 사용될 수 있다. 기술은 유전자가 세포에 의해 발현가능하고, 바람직하게는 그의 세포 자손에 의해 유전가능하고 발현가능하도록, 세포에의 유전자의 안정한 전달을 제공해야 한다. 일부 실시양태에서, 전달 방법은 세포에의 선택가능한 마커 또는 태그 서열의 전달을 포함한다. 이어서 세포는 전달된 유전자를 흡수하였고 발현하고 있는 세포를 단리하기 위한 선택 하에 놓인다. 바람직한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드(들) 또는 유전자는 세포에서 안정하게 발현되는 관점에서 렌티바이러스 벡터에 포함된다.

[0355] 한 실시양태에서, 항원 인식 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR)는 확장 상 동안 및 분화 전에 HSPC 내로 도입되어, 항원 인식 수용체-발현 HSPC 및/또는 항원 인식 수용체-발현 NK 세포를 형성한다. 바람직한 실시양태에서, 항원 인식 수용체 CAR은 확장 상 동안 및 분화 전에 HSPC 내로 도입되어, CAR-HSPC 및/또는 CAR-NK 세포를 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 인식 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR)는 확장 후에 및 분화 상 동안 단리된 풍부화된 $CD56^+$ NK 세포 내로 도입되어, 항원 인식 수용체-발현 HSPC 및/또는 항원 인식 수용체-발현 NK 세포를 형성한다. 바람직한 실시양태에서, 항원 인식 수용체 CAR은 확장 후에 및 분화 상 동안 단리된 풍부화된 $CD56^+$ NK 세포 내로 도입되어, CAR-HSPC 및/또는 CAR-NK 세포를 형성한다. 상기 언급된 항원 인식 수용체 도입, CAR 도입, 세포 확장, 및 세포 분화는 각각 상기 및 하기 기재된 바와 같이 수행된다.

[0356] 상기 기재된 상이한 방법은 CAR, 또는 또 다른 항원 인식 수용체를 세포 내로 도입하는 것을 수반한다. 비-제한적 예로서, CAR 또는 TCR은 하나의 플라스미드 벡터에 의해 코딩된 트랜스진(들)으로서 도입될 수 있다. 플라스미드 벡터는 또한 상기 벡터를 받은 세포의 확인 및/또는 선택을 제공하는 선택 마커를 함유할 수 있다.

[0357] 폴리펩티드, 예컨대 CAR 또는 TCR은 세포 내로의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 도입의 결과로서 세포에서 계내에서 합성될 수 있다.

[0358] 세포 내로의 폴리뉴클레오티드 구축물의 바이러스 매개된 도입을 위한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 비-제한적 예로서 재조합 바이러스 벡터 (예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스)를 포함한다.

[0359] NK 세포 조성물 및/또는 제제의 동결보존

[0360] 유전자 조작이 있는 또는 없는 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 하나 이상의 백 (또는 단위)에서 나누어지고 동결될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 약 5천만 내지 약 5억개의 총 세포는 단일 백 (또는 단위)에서 동결된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 약 1억 내지 약 5억개의 세포는 단일 백 (또는 단위)에서 동결된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 약 5천만, 1억, 2억, 3억, 4억 또는 4억개의 세포는 단일 백 (또는 단위)에서 동결된다. 일부 실시양태에서 단일 백 (또는 단위)은 용량 당 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 세포를 함유한다.

일부 실시양태에서, 단일 백 (또는 단위)은 약 1억, 약 2억, 약 3억, 약 4억, 약 5억, 약 6억, 약 7억5천만, 약 10억, 약 15억 또는 약 20억개의 생존 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 단일 백은 용량 당 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 $CD56^+$ 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 단일 백 (또는 단위)은 약 1억, 약 2억, 약 3억, 약 4억, 약 5억, 약 6억, 약 7억5천만, 약 10억, 약 15억 또는 약 20억개의 생존 $CD56^+$ 세포를 함유한다.

[0361] 바람직한 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 동결되거나 동결보존된다. 또 다른 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 신선하며, 즉, 세포는 확장 또는 동결보존 전에 이전에 동결되지 않았다. 용어 "동결된/동결하는" 및 "동결보존된/동결보존하는/동결보존"은 본 출원에서 상호교환가능하게 사용된다. 동결보존은 세포를 생존 형태로 보존하는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의할 수 있다. 세포의 동결은 통상적으로 파괴적인데, 이는 냉각시, 세포 내의 물이 동결되어, 세포막에 대한 삼투 효과, 세포 탈수, 용질 농도, 및 얼음 결정 형성에 의해 유발되는 손상을 초래하기 때문이다. 얼음이 세포 외부에서 형성됨에 따라, 이용가능한 물은 용액으로부터 제거되고, 세포로부터 빠져나가, 삼투 탈수를 유발하고, 용질 농도를 상승시키며, 이는 결국 세포를 파괴한다. 논의에 대해서는, 문헌 [Mazur, P., *Cryobiology* 14:251-272, 1977]을 참조한다.

[0362] 이들 손상 효과는 (a) 동결보호제의 사용, (b) 동결 속도의 제어, 및 (c) 분해 반응을 최소화하는 충분히 낮은 온도에서의 저장에 의해 회피될 수 있다.

[0363] 사용될 수 있는 동결보호제는 디메틸 술폭시드 (DMSO) (Lovelock and Bishop, *Nature* 183:1394-1395, 1959; Ashwood-Smith, *Nature* 190:1204-1205, 1961); 글리세롤, 폴리비닐피롤리딘 (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85:576, 1960); 폴리에틸렌 글리콜 (Sloviter and Ravdin, *Nature* 196:548, 1962); 알부민, 덱스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리트리톨, D-리비톨, D-만니톨 (Rowe *et al.*, *Fed. Proc.* 21:157, 1962); D-소르비톨, i-이노시톨, D-락토스, 콜린 클로라이드 (Bender *et al.*, *J. Appl. Physiol.* 15:520, 1960); 아미노산 (Phan The Tran and Bender, 1960, Exp. Cell Res. 20:651, 1960); 메탄올, 아세트아미드, 글리세롤 모노아세테이트 (Lovelock, *Biochem. J.* 56:265, 1954); 무기 염 (Phan The Tran and Bender, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:388, 1960; Phan The Tran and Bender, in Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, Ilbery ed., Butterworth, London, p. 59, 1961), 및 크리오스토르(CryoStor)® CS5 또는 CS10 (바이오라이프 솔루션즈 인크.(BioLife Solutions Inc.), 미국 워싱턴주 보텔)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, DMSO가 사용된다. 예를 들어, DMSO는 세포에 비독성인 농도로 사용된다. 추가적으로, DMSO는 조성물의 최대 약 20 %, 조성물의 최대 약 15 %, 조성물의 최대 약 10 %, 조성물의 최대 약 5 %, 조성물의 최대 약 2 %, 조성물의 최대 약 1 %, 또는 조성물의 최대 약 0.5 %를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈장의 첨가 (예를 들어, 최대 약 20 내지 25 %의 농도)는 DMSO의 보호 효과를 증강시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 단백질, 예컨대 예를 들어, 인간 혈청 알부민의 첨가 (예를 들어, 최대 약 2 내지 10 %의 농도)는 DMSO의 보호 효과를 증강시킬 수 있다. DMSO의 첨가 후, 세포는 동결까지 0℃에서 유지되어야 하는데, 이는 약 1 %의 DMSO 농도는 4℃ 초과의 온도에서 독성일 수 있기 때문이다.

[0364] 또 다른 실시양태에서, 20 % DMSO 및 8 % 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 배지가 사용된다. 이어서 이 혼합물은 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10 % 및 4 %이도록 배지로 1:1 희석된다. 이어서 이 혼합물 중의 세포는 분 당 1° 의 속도로 -80℃로 동결되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에서 저장된다.

[0365] 제어된 느린 냉각 속도는 중요할 수 있다. 상이한 동결보호제 (Rapatz et al., *Cryobiology* 5(1):18-25, 1968) 및 상이한 세포 유형은 상이한 최적 냉각 속도를 갖는다 (예를 들어, 골수-줄기 세포의 생존에 대한 및 그들의 이식 잠재성에 대한 냉각 속도의 효과에 대해서는, 문헌 [Rowe and Rinfret, *Blood* 20:636, 1962]; [Rowe, *Cryobiology* 3(1):12-18, 1966]; [Lewis, *et al.*, *Transfusion* 7(1):17-32, 1967]; 및 [Mazur, *Science* 168:939-949, 1970] 참조). 물이 얼음으로 변하는 융합 상의 열은 최소로 유지되어야 한다. 냉각 절차는 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 프로그램가능한 동결 장치 또는 메탄올 조 절차의 사용에 의해 수행될 수 있다.

[0366] 프로그램가능한 동결 장치는 최적 냉각 속도의 결정을 허용하며, 표준 재현가능한 냉각을 용이하게 한다. 프로그램가능한 제어된-속도 동결기, 예컨대 크리오메드(Cryomed) 또는 플라나(Planar)는 목적하는 냉각 속도 곡선으로의 동결 요법의 조정을 허용한다. 예를 들어, 10% DMSO 및 20% 혈장 중 골수 세포에 대해, 최적 속도는 0℃에서 -80℃까지 분 당 1℃ 내지 3℃이다. 바람직한 실시양태에서, 0℃에서 -80℃까지 분 당 1℃ 내지 3℃의 이 냉각 속도가 사용될 수 있다. 세포를 보유하는 용기는 극저온 온도에서 안정하고, 동결 및 해동 둘 다의 효과적인 제어를 위해 급속한 열 전달을 허용해야 한다. 밀봉된 플라스틱 바이알 (예를 들어, 눈크(Nunc), 휘튼

크리얼스(Wheaton Cryule)®)) 또는 유리 앰풀은 다수의 소량 (1 내지 2 ml) 또는 보다 많은 양 (예를 들어, 5 내지 30 ml)을 위해 사용될 수 있는 반면, 보다 큰 부피 (20 내지 200 ml)는 냉각 동안의 보다 양호한 열 전달을 위해 금속 플레이트 사이에 보유된 폴리올레핀 백 (예를 들어, 델-메드(Del-Med)) 또는 에틸렌 비닐 아세테이트 동결기 백 (예를 들어, 오리진(OriGen))에서 동결될 수 있다. 예로서, 골수 세포의 백은 이들을 대략 3℃/분의 냉각 속도를 제공하는 -80℃ 동결기에 정치함으로써 성공적으로 동결되었다.

[0367] 대안적인 실시양태에서, 메탄올 조 냉각 방법이 사용될 수 있다. 메탄올 조 방법은 대규모로 다수의 작은 항목의 통상적인 동결보존에 매우 적합하다. 방법은 동결 속도의 수동 제어 및 속도를 모니터링하기 위한 레코더를 요구하지 않는다. 바람직한 실시양태에서, DMSO-처리된 세포는 얼음 상에서 사전-냉각되고, 냉장된 메탄올을 함유하는 트레이에 옮겨지며, 이는 기계적 냉장고 (예를 들어, 해리스(Harris) 또는 레브코(Revco))에서 -80℃에서 정치된다. 메탄올 조 및 샘플의 열전대 측정은 분 당 1℃ 내지 3℃의 목적하는 냉각 속도를 나타낸다. 적어도 2시간 후, 시편은 -80℃의 온도에 도달하였고, 영구 저장을 위해 액체 질소 (-196℃) 내로 직접적으로 정치될 수 있다.

[0368] 철저한 동결 후, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 장기 극저온 저장 용기에 급속하게 옮겨질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 액체 질소 (-196℃) 또는 그의 증기 (약 -140℃ 내지 -180℃)에서 극저온으로 저장된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 샘플은 액체 질소 증기 상에서 (예를 들어, 약 -140℃ 내지 -180 ℃에서) 극저온으로 저장된다. 이러한 저장은 열 누출 및 질소 소실이 최소화되도록, 극도로 낮은 진공 및 내부 초절연을 갖는 대형 써모스(Thermos)® 용기와 유사한 고도로 효율적인 액체 질소 냉장고의 이용가능성에 의해 크게 용이하게 된다.

[0369] 적합한 래킹 시스템은 상업적으로 입수가능하며, 목록화, 저장, 및 개별적 시편의 회수에 사용될 수 있다.

[0370] 생존 세포의 동결보존의 다른 방법, 또는 그의 변형이 이용가능하며, 사용을 위해 상정된다 (예를 들어, 냉각 금속-거울 기술; 문헌 [Livesey and Linner, *Nature* 327:255, 1987]; [Linner *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 34(9):1123-1135, 1986]; 또한 세칸(Senkan) 등에 의한 미국 특허 번호 4,199,022, 슈바르츠(Schwartz)에 의한 미국 특허 번호 3,753,357, 파이(Fahy)에 의한 미국 특허 번호 4,559,298 참조).

[0371] 동결보존된 또는 동결된 세포는 바람직하게는 신속하게 해동되고 (예를 들어, 37° 내지 41℃에서 유지된 수조에서), 해동 즉시 냉장된다. 구체적인 실시양태에서, 동결된 세포를 함유하는 바이알은 부드러운 회전과 함께 가온 수조에서 그의 목까지 침지되어 세포 현탁액의 혼합을 보장할 것인데, 이는 그것이 해동하고, 수조로부터 내부 얼음 덩어리로의 열 전달을 증가시키기 때문이다. 얼음이 완전히 용해되자마자, 바이알은 얼음에 즉시 정치된다.

[0372] 한 실시양태에서, 동결보존된 NK 세포 조성물 및/또는 제제는 해동되고, 완전한 제제, 또는 그의 부분은 이를 필요로 하는 (예를 들어, 백혈병, 예컨대 AML; 또 다른 혈액 악성종양; 바이러스 감염 (예를 들어, HIV, HSV1 또는 1, A, B, 또는 C형 간염, 지카, SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2 등; 또는 본원에 개시된 바와 같은 다른 감염을 갖는) 인간 또는 동물 환자 내로 주입된다. 관련 기술분야에 공지된 해동된 세포의 프로세싱에 관한 몇몇 절차는 이용가능하며, 목적하는 경우 채용될 수 있다.

[0373] 해동시 세포 클럼핑을 방지하기 위해 세포를 처리하는 것이 요망될 수 있다. 클럼핑을 방지하기 위해, 동결 전에 및/또는 후에 DN아제의 첨가 (Spitzer *et al.*, *Cancer* 45:3075-3085, 1980), 저분자량 덱스트란 및 시트레이트, 및/또는 히드록시에틸 전분 (Stiff *et al.*, *Cryobiology* 20:17-24, 1983) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 절차는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 개시된 방법에 사용될 수 있다.

[0374] 동결보호제는, 인간에서 독성인 경우, 해동된 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 치료적 사용 전에 제거되어야 한다. 동결보호제로서 DMSO를 채용하는 실시양태에서, 세포 소실을 회피하기 위해 이 단계를 생략하는 것이 바람직하다. 그러나, 동결보호제의 제거가 요망되는 경우, 제거는 바람직하게는 해동시 달성된다.

[0375] 예를 들어, 동결보호제의 제거는 비유의한 농도로 동결보호제를 달성하는 희석에 의한 것일 수 있다. 이는 배지의 첨가, 이어서, 필요에 따라, 세포를 펠릿화하기 위한 원심분리의 1개 이상의 사이클, 상청액의 제거, 및 세포의 재현탁에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 해동된 세포 중의 세포내 DMSO는 회수된 세포에 유해하게 영향을 미치지 않을 수준 (1% 미만)까지 감소될 수 있다. 이는 바람직하게는 DMSO 제거 동안 일어나는 삼투 구배를 잠재적으로 손상시키는 것을 최소화하기 위해 서서히 수행된다.

[0376] 동결보호제의 제거 후, 세포 카운트 (예를 들어, 혈구계측기의 사용에 의해) 및 생존율 시험 (예를 들어, 트리

판 블루 배제에 의해; Kuchler, Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pa., pp. 18-19, 1977; Methods in Medical Research, Eisen et al., eds., Vol. 10, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, pp. 39-47, 1964)은 세포 생존을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 생존 항원 (예를 들어, CD56) 양성 세포의 백분율은 세포의 분취물 중의 7-AAD (또는 생존 세포에 의해 배제된 다른 적합한 염료)를 배제한 항원 양성 세포의 수를 세포의 분취물 중의 유핵 세포 (TNC) (생존 및 비-생존 둘 다)의 총 수로 나누어 계산함으로써 결정될 수 있다. 이어서 생존 항원 양성 세포의 수는 생존 항원 양성 세포의 백분율을 TNC로 곱함으로써 결정될 수 있다.

[0377] 동결보존 전에 및/또는 해동 후에, 유핵 세포의 총 수, 또는 구체적인 실시양태에서, $CD56^+$ 세포의 총 수가 결정될 수 있다. 예를 들어, 총 유핵 세포 카운트는 혈구계측기 및 트리판 블루 염료의 배제를 사용함으로써 수행될 수 있다. 높은 세포충실성의 것인 시편은 수동 카운팅을 위한 적절한 농도 범위로 희석될 수 있다. 생성물에 대한 최종 세포 카운트는 임의의 희석 인자에 대해 보정된다.

[0378] 총 유핵 세포 카운트는 mL 당 생존 유핵 세포 x 밀리리터 (ml)로 생성물의 부피와 동등하다. 샘플 중의 $CD56^+$ 양성 세포의 수는 예를 들어, 형광색소에 접합된 항-CD56 모노클로날 항체를 사용한 유동 세포계측법의 사용에 의해 결정될 수 있다.

[0379] NK 세포 조성물 및/또는 제제는 고형 종양, 조혈 악성종양, 바이러스성 장애, 박테리아 감염 등의 치료를 위한 면역치료에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 이를 필요로 하는 대상체 (환자로도 지칭됨)에서 종양 성장을 억제하기 위해 투여된다. 본 발명의 이 측면에 따른 방법은 치료 유효량의 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 대상체에게 투여함으로써 영향을 받는다. 본원에 사용된 "치료하는" 또는 "치료"는 질환의 증상, 합병증, 또는 생화학적 징후의 발병을 감소시키거나 지연시키기 위한 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 투여, 증상을 경감시키는 것 또는 질환, 상태, 또는 장애 (예를 들어, 암, 전이성 암, 전이성 고형 종양, 바이러스성 또는 박테리아성 증상)의 추가의 발달을 정지시키거나 억제하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 치료는 예방적, 즉, 보조요법 (재발을 예방하거나 질환의 발병을 지연시키기 위한, 또는 그의 임상적 또는 준임상적 증상의 소견을 예방하기 위한) 또는 질환의 소견 후의 증상의 치료적 억제 또는 경감으로서일 수 있다.

[0380] 한 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 암, 예컨대 고형 종양 또는 혈액 악성종양, 예컨대 예를 들어, 백혈병 또는 림프종 등을 감소시키거나 제거하는데, 또는 그의 발생 또는 재발을 예방하는데 유효한 양으로 투여된다. "고형 종양 또는 혈액 악성종양을 감소시키거나 제거하는데 또는 그의 발생 또는 재발을 예방하는데 유효한 양" 또는 "과다증식성 질환을 감소시키거나 제거하는데 또는 그의 발생 또는 재발을 예방하는데 유효한 양"은 환자 시험 데이터, 생존 데이터, 종양 마커 수준의 상승 또는 억제, 유전적 프로파일 또는 환경 인자에의 노출에 기반한 감소된 감수성에 의해 측정된 바와 같은 종양 질환 상태 또는 과다증식성 질환에 대한 치료 후 대상체의 결과 또는 생존을 개선시키는 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 양을 지칭한다. "종양 성장을 억제하는"은 종양의 크기 또는 생존율 또는 세포의 수를 감소시키는 것을 지칭한다. "암", "악성종양", "고형 종양", 또는 "과다증식성 질환"은 동의어적 용어로서 사용되며, 세포의 비제어된 비정상적 증식; 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산되는 (즉, 전이하는) 질환에 걸린 세포의 능력; 뿐만 아니라 임의의 다른 특징적인 구조적 및/또는 분자적 특색을 특징으로 하는 임의의 다수의 질환을 지칭한다. "암성", "악성 세포", 또는 "고형 종양 세포"는 특이적 구조적 특성을 갖고, 분화를 결여하며, 침습 및 전이할 수 있는 세포로서 이해된다. "암"은 암종 및 육종을 포함한, 포유동물에서 발견되는 모든 유형의 암 또는 신생물 또는 악성 종양을 지칭한다. 예는 유방, 폐, 비-소세포 폐, 위, 뇌, 두경부, 수모세포종, 골, 간, 결장, 비뇨생식기, 방광, 비뇨기, 신장, 고환, 자궁, 난소, 자궁경부, 또는 전립선, 뿐만 아니라 흑색종, 중피종, 및 육종의 암이다 (문헌 [DeVita, *et al.*, (eds.), Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2001] 참조; 이 참고문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). "과다증식성 질환"은 세포가 정상적인 조직 성장보다 더 급속하게 증식하는 임의의 질환 또는 장애를 지칭한다. 따라서, 과다증식하는 세포는 정상적인 세포보다 더 급속하게 증식하고 있는 세포이다.

[0381] "고형 종양"은 육종, 흑색종, 암종, 또는 다른 고형 종양 암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. "육종"은 배아 결합 조직과 같은 물질로 구성되고, 일반적으로 원섬유성 또는 균질한 물질에 포매된 밀접하게 패킹된 세포로 구성된 종양을 지칭한다. 육종은 연골육종, 섬유육종, 림프육종, 흑색육종, 점액육종, 골육종, 아베메티 육종, 지방 육종, 지방육종, 포상 연부 육종, 사기질모세포 육종, 포도형 육종, 녹색종 육종, 융모막 암종, 배아

육종, 윌름스 종양 육종, 자궁내막 육종, 간질 육종, 유잉 육종, 근막 육종, 섬유모세포 육종, 거대 세포 육종, 과립구성 육종, 호지킨 육종, 특발성 다발성 색소침착 출혈성 육종, B 세포의 면역모세포 육종, T-세포의 면역모세포 육종, 옌센 육종, 카포시 육종, 쿠퍼 세포 육종, 혈관육종, 백혈육종, 악성 중간엽종 육종, 방골 육종, 망상구 육종, 라우스 육종, 장액낭종 육종, 윤활막 육종, 및 혈관확장성 육종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0382] "흑색종"은 피부 및 다른 기관의 멜라닌세포계로부터 발생하는 종양을 지칭한다. 흑색종은 예를 들어, 말단-흑자 흑색종, 멜라닌결핍성 흑색종, 양성 소아 흑색종, 클라우드만 흑색종, S91 흑색종, 하딩-파시 흑색종, 소아 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 악성 흑색종, 결절성 흑색종, 손발톱밑 흑색종, 및 표재성 확산 흑색종을 포함한다.

[0383] "암종"은 주위의 조직에 침윤하고 전이를 발생시키는 경향이 있는 상피 세포로 구성된 악성 새로운 성장을 지칭한다. 예시적인 암종은 예를 들어, 세엽 암종, 선방상 암종, 선낭성 암종, 선낭 암종, 선종성 암종, 부신 피질의 암종, 폐포 암종, 폐포 세포 암종, 기저 세포 암종, 기저세포 암종, 기저세포 암종, 기저편평 세포 암종, 세기관지폐포 암종, 세기관지 암종, 기관지원성 암종, 대뇌모양 암종, 담관세포 암종, 융모막 암종, 콜로이드 암종, 면포 암종, 소체 암종, 사상 암종, 갑옷 암종, 피부 암종, 원통 암종, 원통 세포 암종, 관 암종, 고막 암종, 배아 암종, 뇌질모양 암종, 표피모양 암종, 상피 선양 암종, 외생 암종, 궤양외 암종, 섬유성 암종, 젤라틴모양 암종, 젤라틴성 암종, 거대 세포 암종, 거대세포 암종, 선암종, 과립막 세포 암종, 모상 암종, 혈액 암종, 간세포 암종, 허틀 세포 암종, 유리질 암종, 부신모양 암종, 영아 배아 암종, 제자리 암종, 표피내 암종, 상피내 암종, 크롬페허 암종, 쿨히츠키-세포 암종, 대-세포 암종, 수정체 암종, 수정체 암종, 지방종성 암종, 림프상피 암종, 골수 암종, 골수 암종, 멜라닌 암종, 점액 암종, 점액분비성 암종, 점막세포 암종, 맥락수막염 암종, 점액 암종, 점액 암종, 점액모양 암종, 비인두 암종, 귀리 세포 암종, 골화성 암종, 유골 암종, 유두상 암종, 문맥주위 암종, 침습전 암종, 유극 세포 암종, 수질모양 암종, 신장의 신세포 암종, 예비 세포 암종, 육종성 암종, 경화형 암종, 음낭 암종, 반지 세포 암종, 단순 암종, 소세포 암종, 절구 세포 암종, 방추 세포 암종, 해면 암종, 편평 암종, 편평 세포 암종, 현암종, 혈관확장성 암종, 혈관확장성 암종, 이행 세포 암종, 결절성 암종, 결절성 암종, 사마귀모양 암종, 및 비플로섬 암종을 포함한다.

[0384] "백혈병"은 혈액-형성 기관의 진행성 악성 질환을 지칭하며, 일반적으로 혈액 및 골수에서의 백혈구 및 그들의 전구체의 왜곡된 증식 및 발달을 특징으로 한다. 백혈병은 일반적으로 (1) 질환의 지속기간 및 특징 - 급성 또는 만성; (2) 관여하는 세포의 유형; 골수 (골수성), 림프 (림프성), 또는 단핵구성; 및 (3) 혈액 중의 비정상적인 세포의 수의 증가 또는 비-증가 - 백혈병성 또는 비백혈병성 (아백혈병성)에 기반하여 임상적으로 분류된다. 백혈병은 예를 들어, 급성 비림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병, 만성 과립구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병, 비백혈병성 백혈병, 백혈구증가성 백혈병, 호염기성 모세포 백혈병, 소 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 피부 백혈병, 배아 백혈병, 호산구성 백혈병, 그로스 백혈병, 유모-세포 백혈병, 조혈모세포 백혈병, 혈구모세포 백혈병, 조직구성 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 백혈구감소성 백혈병, 림프 백혈병, 림프모구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프성 백혈병, 림프모양 백혈병, 림프육종 세포 백혈병, 비만 세포 백혈병, 거핵구성 백혈병, 미세골수모구성 백혈병, 단핵구성 백혈병, 골수모구성 백혈병, 골수구성 백혈병, 골수 과립구성 백혈병, 골수단핵구성 백혈병, 나에겔리 백혈병, 형질 세포 백혈병, 형질구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 리더 세포 백혈병, 쉴링 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 아백혈병성 백혈병, 및 비분화된 세포 백혈병을 포함한다.

[0385] 추가의 암은 예를 들어, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 소세포 폐 종양, 원발성 뇌 종양, 위암, 결장암, 악성 췌장 인슐린종, 악성 카르시노이드, 방광암, 전악성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경모세포종, 식도암, 비뇨생식관암, 악성 고칼슘혈증, 자궁경부암, 자궁내막암, 부신 피질암, 및 전립선암을 포함한다.

[0386] 또 다른 실시양태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 바이러스 감염을 억제하는 방법이 제공된다. 방법은 치료량의 NK 세포 조성물 및/또는 제제를 대상체에게 투여함으로써 영향을 받는다. NK 세포 조성물 및/또는 제제로의 치료에 적합한 바이러스 감염은 HIV, 림프성 맥락수막염 바이러스 (LCMV), 시토메갈로바이러스 (CMV), 우두바이러스, 코로나바이러스 (SARS-CoV 및 SARS-CoV-2), 인플루엔자 및 파라-인플루엔자 바이러스, 지카 바이러스, 간염 (A형 간염, B형 간염, C형 간염, 비-A-비-B 등을 포함함), 단순 포진 바이러스 (HSV 1 또는 HSV 2), 대상 포진 바이러스, 및 타일러 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. NK 세포 조성물 및/또는 제제로의 치료에 적합한 다른 감염성 질환은 기생충 감염, 예컨대 플라스모디움(Plasmodium), 라이슈마니아(Leishmania) 및 톡소플라스마(Toxoplasma) 감염, 및 박테리아 감염, 예컨대 미코박테리아 및 리스테리아

(Listeria)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (바이러스성, 박테리아성 및 원충성 질환의 치료에서 NK 세포의 검토에 대해서는 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Zucchini *et al.*, *Exp. Rev. Anti-Infect. Ther.* 6:867-885, 2008] 참조).

[0387] 본 발명의 일부 측면에 따르면, 질환의 치료를 위한 NK 세포 제제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 예를 들어, NK 세포 제제는 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화되어 예를 들어, 전이성 암, 고형 종양, 혈액 악성종양, 과다증식성 질환, 임의의 바이러스 감염, 박테리아 감염 등의 치료를 위한 NK 세포 조성물을 형성한다.

[0388] 치료 적용, 조성물, 또는 의약은 이러한 질환의 의심이 있거나, 이미 앓고 있는 대상체에게 투여되며, 그의 합병증 및 질환의 발달에서 중간 병리학적 표현형을 포함한 질환의 증상 (생화학적, 조직학적 및/또는 행동적)을 치유하거나 부분적으로 정지시키는데 충분한 양으로 제공된다. 이러한 치료적 치료를 달성하는데 적당한 양은 치료 유효 용량으로 정의된다. 치료적 요법에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 통상적으로 충분한 항-증식 반응이 달성되었을 때까지 몇몇 투여량으로 투여된다. 전형적으로, 항-증식 반응은 모니터링되고, 항-증식 반응이 줄어들기 시작하는 경우 반복된 투여량이 주어진다.

[0389] 본원에 기재된 바와 같은 질환, 예를 들어, 전이성 암, 고형 종양, 혈액 악성종양, 과다증식성 질환, 임의의 바이러스 감염, 박테리아 감염 등의 치료를 위한 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 유효 용량은 투여의 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지 여부, 투여되는 다른 의약, 및 치료가 예방적인지 치료적인지 여부를 포함한 인자에 따라 다양하다. 통상적으로, 환자는 인간이지만, 트랜스제닉 포유동물을 포함한 비인간 포유동물은 또한 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 적정될 필요가 있다.

[0390] 치료 NK 세포 조성물 및/또는 제제로의 투여를 위해, 투여량은 전형적으로 용량 당 약 5천만 내지 약 5억개의 총 세포의 범위이다. 일부 실시양태에서, 투여량은 용량 당 약 5천만, 1억, 2억, 3억, 4억 또는 4억개의 세포이다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 용량은 용량 당 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 용량은 약 1억, 약 2억, 약 3억, 약 4억, 약 5억, 약 6억, 약 7억5천만, 약 10억, 약 15억 또는 약 20억개의 생존 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 용량은 용량 당 약 5천만 내지 약 20억개의 생존 $CD56^+$ 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 용량은 약 1억, 약 2억, 약 3억, 약 4억, 약 5억, 약 6억, 약 7억5천만, 약 10억, 약 15억 또는 약 20억개의 생존 $CD56^+$ 세포를 함유한다.

[0391] 예시적인 치료 요법은 주 당 약 1회, 2회, 또는 심지어 3회, 2주마다 당 1회, 2회 또는 심지어 3회, 월 당 약 1회, 3 내지 6개월마다 약 1회, 또는 6 내지 12개월마다 약 1회의 투여를 수반한다. NK 세포 조성물 및/또는 제제의 다중 투여가 제공될 수 있다. 단일 투여량 사이의 간격은 수 일, 매주, 매월, 매년, 또는 이러한 기간의 일부 조합일 수 있다. 간격은 또한 불규칙적이고, 환자에서의 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 혈액 수준을 측정함으로써 지시된 바와 같을 수 있다. 대안적으로, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 서방형 제제로서 투여될 수 있으며, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자에서의 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 반감기에 따라 다양하다. 투여량 및 투여의 빈도는 치료가 예방적인지 치료적인지 여부에 따라 다양할 수 있다. 예방적 적용에서, 상대적으로 낮은 투여량이 상대적으로 빈번하지 않은 간격으로 긴 기간에 걸쳐 투여된다. 일부 환자는 그들의 삶의 나머지 동안 치료를 받는 것을 계속한다. 치료적 적용에서, 질환의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 및 바람직하게는 환자가 질환 증상 또는 질환 적응증의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지 상대적으로 짧은 간격으로 상대적으로 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자는 예방적 요법이 투여 될 수 있다.

[0392] 질환, 예를 들어, 전이성 암, 고형 종양, 혈액 악성종양, 과다증식성 질환, 임의의 바이러스 감염, 박테리아 감염 등의 치료를 위한 NK 세포 조성물 및/또는 제제의 조성물은 정맥내, 방광내, 동맥내, 두개내, 또는 복강내 수단에 의해 투여될 수 있다.

[0393] 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제는 화학치료 요법 후에 투여된다. 화학치료 요법은 단일 작용제 또는 다중-작용제 요법일 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학치료 요법은 유도 요법 또는 강화 요법이다. 일부 실시양태에서, 화학치료 요법은 구제 요법이다.

[0394] 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 고정 용량은 화학치료 요법 또는 그의 주기, 예컨대 유도 요법 후에 투여될 수 있다. NK 세포 조성물 및/또는 제제의 고정 용량은 또한 강화 요법 또는 그의 주기 후에 투여될 수 있다. NK 세포 조성물 및/또는 제제의 고정 용량은 또한 구제 요법 또는 그의 주기 후에 투여될 수

있다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 고정 용량은 요망되거나 필요한 경우, 제2 유도 요법 또는 그의 주기, 또는 유도 요법의 제2 주기 후에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 고정 용량은 제2 강화 요법 또는 그의 주기 후에 투여될 수 있거나, 또는 강화 요법의 제2 주기는 요망되거나 필요하다. 일부 실시양태에서, NK 세포 조성물 및/또는 제제의 고정 용량은 제2 구제 요법 또는 그의 주기 후에 투여될 수 있거나, 또는 구제 요법의 제2 주기는 요망되거나 필요하다.

[0395] 실시예

[0396] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 실시양태에 의해 범위에 있어서 제한되지 않는다. 사실, 본원에 기재된 것들 외에도, 본 발명의 다양한 변형은 본원의 설명 및 첨부된 도면으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 해당하는 것으로 의도된다.

[0397] 특허, 특허 출원 공개, 및 과학 문헌을 포함한 다양한 간행물이 본원에 인용되며, 이들의 개시내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 예시적인 실시양태가 묘사되고 기재되었지만, 본 발명의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변화가 그에 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

[0398] 실시예 1: NK 세포 조성물 및/또는 제제의 생성

[0399] 본 실시예는 NK 세포 제제의 생산 및 저장 및 NK 세포 조성물로의 그의 제제화를 기재한다.

[0400] 제대혈/태반 혈액 단위(들) (CBU)을 출생시 인간 공여자로부터 수집하였다. 전형적으로, CBU는 수집 후에 동결되고, 선택된 CBU는 공여자 적격이고, 사용 전에 완전히 자격부여된다. 이어서 수집된 혈액을 항-응고제와 혼합하여 응고를 방지하였다. 혈액을 콰란틴 하에서 4℃에서 모니터링된 냉장고에 저장하였다. 받은 단위를 평가하고, 확장을 위해 프로세싱될 단위를 결정하였다.

[0401] 상 1은 조혈 줄기 및 전구 세포의 확장을 수반한다. $CD34^+$ 풍부화된 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)를 조직 배양 처리된 플라스틱 용기 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific) 눈크(Nunc)™ 이지플라스크(EasYFlask)™) 내로 시딩하였다. 풍부화된 $CD34^+$ HSPC를 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0095079 (본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 풀링된 제대혈 단위로부터 제조하였다. 일반적으로, 적어도 4개의 제대혈 단위로부터의 $CD34^+$ 세포를 $CD34^+$ 세포에 대한 풍부화 전에 또는 후에 풀링하였다.

[0402] 조직 배양 처리된 플라스틱 용기를 DPBS (깁코(Gibco)) 중 재조합 인간 피브로넥틴 단편 (타카라 바이오, 인크.(Takara Bio, Inc.); 레트로넥틴® 재조합 인간 피브로넥틴 단편, 5 μg/ml 및 0.8 $\mu g/cm^2$ 표면적) 및 Notch 효능제 ($델타1^{extIgG}$, 2.5 μg/ml 및 0.4 $\mu g/cm^2$ 표면적)의 용액으로 사전-코팅하였다. 배양 배지는 각각 50 ng/ml의 rhSCF (밀테니 비오텍), Flt-3L (밀테니 비오텍), TPO (밀테니 비오텍), 및 IL-6 (밀테니 비오텍), 및 10 ng/ml IL-3 (밀테니 비오텍)으로 보충된, 조혈 세포의 배양 및 확장을 위해 디자인되고 이에 적합한 혈청 무함유 세포 배양 배지 (스템스팬™ 혈청-무함유 확장 배지 II (SFEM II; 스템셀 테크놀로지스))로 이루어졌다. 세포 밀도 < 2 x 10^6개의 세포/ml를 유지하는데 적절한 경우 보다 큰 부피 배양 용기 내로 세포를 통과시키면서, 세포를 14일 동안 배양하였다.

[0403] 동일한 세포 제제를 생산하는 상 1 확장 배양을 위한 대안적 프로토콜은 Notch 효능제로서 $델타1^{extIgG}$의 2.5 내지 10 μg/ml의 정제된 항-인간 Notch 1 항체 (바이오레전드(BioLegend), 리프(LEAF)™ 퓨리파이드(Purified), 클론 MHN1-519)로의 대체를 포함한다.

[0404] 배양 프로세스의 상 2는 확장된 조혈 줄기 및 전구 세포를 NK 세포 표현형으로 분화시킨다. 14-일 확장 상 (상기)의 종료시, 모든 세포를 수집하고, Notch 효능제 ($델타1^{extIgG}$ 또는 레트로넥틴®) 코팅을 갖지 않는 조직 배양 처리된 플라스틱 용기 내로 재-플레이팅하였다. 배양 배지는 5 내지 10 % 열 불활성화된 소 태아 혈청 (FBS; 깁코), 40 ng/ml rhIL-15 (페프로테크(PeproTech)), 및 50 U/ml rhIL-2 (페프로테크)로 보충된 RPMI 1640 (깁코)을 포함한다. 세포 밀도 < 2 x 10^6개의 세포/ml를 유지하는데 적절한 경우 보다 큰 부피 배양 용기 내로 세포를 통과시키면서, 세포를 최대 추가의 14일 동안 배양하였다.

[0405] CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, NKG2A, 및 그랜자임 B, 중간 내지 고 빈도의 퍼포린 및 CD107a, 저 내지 중간 빈도의 NKG2D를 발현하였고, KIR을 실질적으로 발현하지 않았다. 시험된 그들 뱃

치에서 $CD56^+$ 세포는 KIR^-인 것으로 밝혀졌다. (본원에 사용된 "KIR^-"는 KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DL1, 및 KIR3DS1을 지칭한다.) CD16은 저 내지 중간 빈도로 발현되었다. 시험된 그들 뱃치에서, $CD56^-$ 세포는 중간 내지 고 빈도의 그랜자임 B, 고 빈도의 CD107a 및 저 빈도의 퍼포린을 발현하였다. 상기 표 1을 참조한다. 상기 표 2는 또한 예시적인 NK 세포 제제에서의 $CD56^+$ 세포의 표현형적 속성을 나타낸다.

[0406] NK 세포 제제는 또한 대략 25 % 내지 50 % $CD56^-$ 세포를 포함하였다. 이들 세포는 대개 골수 유래되었으며, 수지상 세포, 대식세포 및 과립구를 포함할 수 있다. NK 세포 제제에서 $CD56^-$ 세포에 걸쳐, 하기 세포 표면 마커가 지시된 빈도로 발현되었다: 그랜자임 B는 중간 빈도로 발현되고, CD107a는 고 빈도로 발현된다. 상기 표 3은 예시적인 NK 세포 제제에서의 $CD56^-$ 세포의 표현형적 속성을 나타낸다.

[0407] 도 1a는 28-일 배양의 과정 (상 1 (확장) 및 2 (분화))에 걸친 $CD56^+$ 세포/출발 $CD34^+$ 세포의 증가를 나타낸다. 도 1b는 28-일 세포 배양 프로세스에 걸친 $CD56^+$ 세포 생성의 재현성을 입증한다. 도 1a 및 1b는 상기 기재된 프로세스 후에 생산된 NK 세포 제제의 20개의 뱃치로부터의 결과를 나타낸다.

[0408] 실시예 2: 동물 유래된 혈청 없는 NK 세포 제제의 생산.

[0409] 동물 유래된 혈청의 사용을 회피하기 위해, NK 세포 제제를 생산하는 상 2 배양 (분화)을 위한 대안적 프로토콜은 소 태아 혈청 (FBS)의 열 불활성화된 인간 AB 혈청 (밸리 바이오메디칼(Valley Biomedical))으로의 또는 인간 혈소판 용해물 (밀 크릭 라이프 사이언시스(Mill Creek Life Sciences) PLTMax®)로의 대체를 수반하였다. 출원인은 예상치 않게 실시예 1에 기재된 프로세스의 상 2 (분화 상)에서 열 불활성화된 인간 AB 혈청 또는 인간 혈소판 용해물을 치환할 수 있었다.

[0410] FBS의 인간 AB 혈청 (hABS)으로의 또는 인간 혈소판 용해물 (hPL)로의 대체는 분화 동안 세포 확장 (도 2) 또는 생산된 $CD56^+$ 세포의 수 (도 3)에 대한 최소 효과를 가졌다. hPL은 hABS보다 약간 더 양호하게 배양물의 확장을 유지하였지만, 생성된 세포 표현형은 FBS, hABS, 및 hPL 배양물 중에서 매우 유사하다.

[0411] 도 4 및 5는 배양의 상 2에 사용된 상이한 혈청 보충물을 비교하여 배양의 제28일에, 퍼센트 $CD16^+$ 세포 (도 4) 및 퍼센트 $NKp46^+$ 세포 (도 5)를 둘 다 $CD56^+$ 세포의 퍼센트로서 나타낸다.

[0412] NK 세포 제제, 및 K562 표적 세포를 사용한 시험관내 세포독성 분석을 착수하여 상 2에서의 다양한 혈청 보충물 (FBS, hABS, 또는 hPL)과 배양된 NK 세포 제제를 비교하였다. 도 6 및 7은 hPL로 보충된 배양물이 hABS로 보충된 것들보다 더 많은 세포독성 NK 세포 집단을 발달시켰음을 나타낸다.

[0413] 실시예 3: NK 세포 제제로의 시험관내 세포독성 검정

[0414] 시험관내 세포독성 검정을 제28일 NK 세포 제제, 또는 K562-활성화된 성체 말초 혈액 NK 세포를 이펙터 세포 (E)로서 사용하여 수행하였다. NK 세포 제제를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 형광 표지된 K562 세포 (만성 골수성 백혈병 세포주) 또는 A549 세포 (폐 암종 세포주)는 표적 세포 (T)로서 포함되었다. 세포를 37℃에서 4시간 동안 도 8에 지시된 E:T 비로 공동-인큐베이션하였다. 이어서 세포를 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)로 표지하고, DAPI로 공동-표지된 형광 표적 세포를 유동 세포계측 분석에 의해 죽어가는 및 죽은 표적 세포로서 확인하였다.

[0415] 도 8은 NK 세포 제제 (NK 세포 생성물로 지칭됨)가 유사한 활성으로 K562 및 A549 표적 세포에 대해 활성이었음을 나타낸다 (채워진 원 및 채워진 삼각형으로 지시된 곡선). 대조적으로, K562 세포로 활성화된 성체 말초 혈액 NK 세포 (K562-활성화된 성체 PB NK 세포로 지칭됨)는 K562 표적 세포에 대해 활성이었지만 (비어 있는 원을 갖는 상부 곡선), A549 표적 세포에 대해서는 그렇지 않았다 (비어 있는 삼각형을 갖는 하부 선). 이 연구는 다양한 표적 세포에 대해 활성인 NK 세포 제제의 능력을 입증하였다.

[0416] 실시예 4: NK 세포 제제로의 추가의 시험관내 검정

[0417] NK 세포 제제의 세포독성을 다양한 골수 세포 백혈병 (AML과 유사함) 세포주에 대한 표준 시험관내 세포 살해 검정 (실시예 3에 상기 기재된 바와 같음)에서 시험하였다. 도 9는 NK 세포 제제가 많은 이들 암 세포주에 대한 세포 살해를 나타내었음을 입증한다. 도 9에서, 각각의 세포주에 대해, 좌측 막대는 4시간에서의 세포독성

을 나타내고, 우측 막대는 24시간에서의 세포독성을 나타낸다. K562 세포주는 NK 세포 활성에 대한 허용되는 표준물이며, 양성 대조군으로서 역할을 한다.

[0418] 실시예 5: NK 세포 제제로의 생체내 마우스 이종이식 검정

[0419] U-87 교모세포종 종양 모델에서의 NK 세포 제제의 활성을 NK 세포 제제 처리가 있는 또는 없는 NSG 마우스에서 U-87 종양 부담을 측정함으로써 시험하였다. U-87 세포를 마트리겔(Matrigel)® (많은 조직에서 발견되는 복합 세포외 환경을 닮도록 의도되고, 세포를 배양하기 위한 기질로서의 엔겔브레쓰-홈-스왐(Engelbreth-Holm-Swarm) (EHS) 마우스 육종 세포에 의해 분비되는 젤라틴성 단백질 혼합물)로 시험 NSG 마우스의 뒤쪽 옆구리 내로 피하로 주사하고 (2 x 10^6개의 세포/마우스), 9일 동안 성장시켜 측정가능한 종양을 형성한 후, 마우스 당 NK 세포 제제 (NK 세포 생성물 또는 조성물로 지칭됨)의 1 x 10^7개의 세포를 종양내 주사하였다. 종양 성장을 캘리퍼 측정에 의해 2 내지 3회/주 평가하였다. 도 10은 NK 세포 생성물이 염수 주사 대조군과 비교하여 종양 부담을 감소시킬 수 있었음을 입증한다.

[0420] 도 11은 이 연구에 대한 시간 경과에 따른 비처리 대조군 (원을 갖는 선)에 대한 및 NK 세포 제제 (정사각형을 갖는 선)에 대한 종양 크기의 그래프를 나타낸다. NK 세포 제제는 종양 진행의 유의한 지연을 유발할 수 있었다 (도 11). NK 세포 제제는 종양에서 인간 $CD45^+$ 세포를 검출함으로써 측정된 바와 같이, 주사 후 37-일에 존속하였고 검출가능하였다 (도 11).

[0421] 실시예 6: Notch 1 또는 Notch 2 특이적 항체를 사용한 $CD34^+$ HSPC의 확장.

[0422] $CD34^+$ HSPC를 표준 기질 (5 μg/ml 레트로넥틴® + 2.5 μg/ml DXI) 상에서 또는 5 μg/ml 레트로넥틴® + 5 μg/ml 항-Notch1 항체 (항-Notch 1 Ab) 상에서 또는 5 μg/ml 레트로넥틴® + 10 μg/ml 항-Notch1 Ab 상에서 상기 (실시예 1) 기재된 바와 같이 확장시켰다. 도 12a 내지 d는 Notch 1 또는 Notch 2 항체로의 HSPC의 확장 (본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 번호 2017/0107493 참조)이 DXI를 사용한 확장과 필적하였음을 나타낸다.

[0423] 실시예 7: 종양 세포의 존재 하에서 NK 세포 제제에 의한 시토카인 방출.

[0424] 본 연구를 K562 또는 A549 종양 세포의 존재 및 부재 하에서 NK 세포 제제에 의한 시토카인 인터페론 감마 (IFNγ) 또는 종양 괴사 인자 알파 (TNFα)의 발현을 결정하기 위해 수행하였다. 도 13은 상기 방법에 의해 생산된 NK 세포 제제 (NK 세포 생성물로 지칭됨) 또는 K562 또는 A549 종양 세포를 단독으로, 또는 함께 3일 동안 배양하였음을 나타낸다. 연구를 삼중으로 실행하였다. 3일 후, 시토카인 수준을 루미넥스 검정에 의해 결정하였다. (검출의 한계는 1 pg/ml의 시토카인이었다.) 도 13에 나타내어진 바와 같이, IFNγ (도 13a) 및 TNFα (도 13b) 수준 둘 다는 NK 세포 제제를 종양 세포의 존재 하에서 공동-배양한 경우 증가하였다. 이들 결과는 제제 중의 NK 세포가 종양 세포의 존재 하에서 보다 활성이 되었음을 나타내었다.

[0425] 실시예 8: 유전자 변형된 NK 세포 제제의 생산을 위한 형질도입 시간 과정.

[0426] 본 연구를 유전자 변형을 위한 확장 및 분화 상 동안 적합한 시간을 결정하기 위해 수행하였다. VSVG (소수포 구내염 바이러스) 또는 Cocal 위형 바이러스 외피 당단백질 중 어느 하나를 갖는 GFP (녹색 형광 단백질) 렌티바이러스를 사용하여, 확장 상 (제1일, 제4일, 제7일, 또는 제14일) 또는 NK 분화 상 (제21일) 동안의 상이한 시점에서 2개의 상이한 감염의 다중도 (MOI)를 사용하여 $CD34^+$ 제대혈 세포를 형질도입시키고, 28일의 NK 세포 배양을 계속하였다. 제28일에 세포를 CD56, CD16, CD14, CD15, 및 CD7을 포함한 상이한 세포 집단에 대해 면역표현형결정하였다. 도 14는 제1일, 제4일, 또는 제7일에 형질도입 후에 세포 계통에 걸친 보다 일관된 분포가 관찰되었음을 나타낸다.

[0427] 실시예 9: 인간 CD19 발현 세포를 표적화하는 CAR 구축물의 제조

[0428] 항-CD19 scFV (FMC63), 인간 IgG_4로부터의 힌지 영역, CD28 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극성 도메인 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CAR 구축물을 제조하였다. 발현 구축물은 선택가능한 마커로서 tEGFR (도 15) 또는 인간 IL-15 (도 16) 중 어느 하나를 포함하였다. CAR 구축물을 일반적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 HSPC 내로 형질도입시켰다.

[0429] 실시예 10: 확장 상 동안 IL-15 프라이밍을 사용하는 NK 세포의 제조 및 특징규명

[0430] 본 실시예는 상 1 확장 단계 동안 IL-15가 첨가되는 NK 세포 제제의 생산 및 특징규명을 기재한다.

[0431] 상 1은 조혈 줄기 및 전구 세포의 확장을 수반하였다. $CD34^+$ 풍부화된 조혈 줄기 및 전구 세포 (HSPC)를 조직 배양 처리된 플라스틱 용기 (써모 사이언티픽 눈크™ 이지플라스크™) 내로 시딩하였다. 풍부화된 $CD34^+$ HSPC를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 조직 배양 처리된 플라스틱 용기를 DPBS (깁코) 중 재조합 인간 피브로넥틴 단편 (타카라 바이오, 인크.; 레트로넥틴® 재조합 인간 피브로넥틴 단편, 5 μg/ml 및 0.8 μg/cm^2 표면적) 및 Notch 효능제 (델타1^{extIgG}; 2.5 μg/ml 및 0.4 μg/cm^2 표면적)의 용액으로 사전-코팅하였다. 배양 배지는 각각 50 ng/ml의 rhSCF (밀테니 비오텍), Flt-3L (밀테니 비오텍), TPO (밀테니 비오텍), 및 IL-6 (밀테니 비오텍), 및 10 ng/ml IL-3 (밀테니 비오텍)으로 보충된, 조혈 세포의 배양 및 확장을 위해 적합하고 이에 적응된 세포 배양 배지 (스템스팬™ 혈청-무함유 확장 배지 II (SFEM II; 스템셀 테크놀로지스))를 포함하였다. 세포 밀도 < 2 x 10^6개의 세포/ml를 유지하는데 적절한 경우 보다 큰 부피 배양 용기 내로 세포를 통과시키면서, 세포를 14일 동안 배양하였다. 확장 배양을 제7일 내지 제14일 또는 제10일 내지 제14일에 40 ng/ml로 IL-15 (페프로 테크)의 첨가에 의해 프라이밍하였다.

[0432] 배양 프로세스의 상 2는 확장된 조혈 줄기 및 전구 세포를 NK 세포 표현형으로 분화시킨다. 14-일 확장 상 (상기 상 1)의 종료시, 모든 세포를 수집하고, Notch 효능제 (델타1^{extIgG} 또는 레트로넥틴®) 코팅을 갖지 않는 배양 용기 (지-렉스(G-Rex)100M 용기, 윌슨울프(WilsonWolf)) 내로 1000 ml 배양 배지 중 1 x 10^6개의 세포/ml의 세포 밀도로 재-플레이팅하였다. 배양 배지는 5 % 인간 혈소판 용해물 (hPL; 밀 크릭 라이프 사이언시스), 40 ng/ml rhIL-15 (페프로테크), 및 50 U/ml rhIL-2 (페프로테크)로 보충된 RPMI 1640 (깁코)을 포함하였다. 용기 중의 배지의 50%를 분화로의 7일에 신선한 분화 배지로 대체하면서, 세포를 추가의 10일 동안 배양하였다.

[0433] CD56 외에도, $CD56^+$ 세포는 고 빈도의 NKp30, NKp46, NKp44, 및 NKG2A, 및 중간 빈도의 CD16, NKp44, 및 NKG2D를 발현하였다.

[0434] 표 4는 방법에 의해 생산된 예시적인 NK 세포 제제에서의 CD56+ 세포의 표현형적 속성을 나타낸다.

[0435] 표 4. CD56+ 세포의 표현형적 속성

[0436]

$CD56^+$ 세포	**빈도 (평균 ± SD)**
CD56+ 집단	74.03 ± 1.40
$CD56^+$ 집단 내의 빈도	
$CD16^+$	35.21 ± 3.62
$NKp30^+$	71.29 ± 23.3
$NKp44^+$	25.39 ± 3.47
$NKp46^+$	84.31 ± 8.16
$NKG2A^+$	63.86 ± 4.49
$NKG2D^+$	50.01 ± 16.78

[0437] NK 세포 제제는 또한 대략 26% $CD56^-$ 세포를 포함하였다. 상기 이전의 방법과 같이, 이들 세포는 대개 골수 유래되고, 수지상 세포, 대식세포, 및 과립구를 포함할 수 있다. 표 5는 이 방법에 의해 생산된 예시적인 NK 세포 제제에서의 $CD56^-$ 세포의 표현형적 속성을 나타낸다.

[0438] 표 5. $CD56^-$ 세포의 표현형적 속성

$CD56^-$ 세포	**빈도 (평균 ± SD)**
$CD14^- CD15^+$	6.46 ± 1.26
$CD14^+ CD15^+$	6.96 ± 1.19
$CD14^+ CD15^-$	0.55 ± 0.19
$CD14^- CD15^-$	(하기 세포 하위세트)
$CD11b^+ CD11c^+$	3.67 ± 1.08
$HLA\text{-}DR^+$	4.06 ± 0.65
$CD7^+$	0.50 ± 0.14
$CD33^+$	1.83 ± 0.81
$CD34^+$	0.13 ± 0.14
비확인됨	0.61 ± 0.21

[0439]

[0440] 도 17a 및 17b는 상기 기재된 방법에 따라 제조 규모에서 생산된 NK 세포 제제의 4개의 뱃치의 결과를 나타낸다. 도 17a는 24-일 배양의 과정 (상 1 및 2)에 걸친 $CD56^+$ 세포/출발 $CD34^+$ 세포의 증가를 나타낸다. 도 17b는 24-일 세포 배양 프로세스에 걸친 $CD56^+$ 세포 생성의 재현성을 입증한다.

[0441] 실시예 11: IL-15 프라이밍으로 생산된 NK 세포 제제에 의한 시험관내 세포 살해

[0442] 본 실시예에서 표적 세포의 반복 용량을 일련적으로 살해하는 IL-15 프라이밍으로 생산된 NK 세포 제제의 능력이 입증된다. 일련 살해 검정을 실시예 3에 기재된 표준 시험관내 세포 살해 검정의 변형으로 연장된 지속기간에 걸쳐 실행하였다. 본 실시예에서, 세포 살해 검정은 카즈미-1 골수 세포 백혈병 세포주 (AML과 유사함)를 사용하였다. 신선한 NK 세포 제제 (도 18a) 또는 동결보존되고 해동된 NK 세포 제제 (도 18b)를 그의 초기 용량으로 검정 내로 플레이팅하고, 총 3일 동안 24시간마다 표적 세포의 반복 용량을 받게 하고, 표적 세포의 특이적 세포 사멸에 대한 분석을 각각의 챌린지 후 24시간에 수행하였다. 추가의 검정을 총 10일 동안 3일마다 표적 세포의 반복 용량을 받은 신선한 NK 세포 제제를 사용하여 플레이팅하고 (도 18c), 표적 세포의 특이적 세포 사멸에 대한 분석을 각각의 챌린지 후 24시간에 수행하였다. 신선한 NK 세포 제제 및 동결보존되고 해동된 NK 세포 제제 둘 다는 각각의 실험의 지속기간에 걸쳐 반복 표적 첨가에 대한 용량-의존적 세포 살해를 달성하였으며, 이는 적어도 10일 동안 표적 세포를 일련적으로 살해하는 NK 세포의 능력을 입증한다.

[0443] 실시예 12: NK 세포 제제로의 생체내 마우스 AML 이종이식 검정

[0444] 카즈미-1 AML 미만성 종양 모델에서의 NK 세포 제제의 활성을 NK 세포 제제 처리가 있는 또는 없는 NSG 마우스에서 카즈미-1 종양 부담 및 동물 생존을 측정함으로써 시험하였다. 반딧불이-루시페라제 발현 카즈미-1 세포를 제0일에 NSG 마우스의 꼬리 정맥 내로 정맥내로 주사한 후 (2×10^6개의 세포/마우스), 제2일 및 제6일에 마우스 당 NK 세포 제제의 2×10^7개의 세포의 2개의 용량을 정맥내 주사하였다. 종양 성장을 생물발광 영상화에 의해 주 당 1 내지 2회 평가하였다. 완충제-주사된 대조군 처리에 비해, NK 세포 제제는 종양 진행을 억제하였고 (도 19, p 값: * = < 0.05, ** = < 0.01, *** = < 0.001), 마우스에서 중위 생존을 유의하게 연장시켰다. (도 20; 83.5일 대 70일, 로그-순위 검정에 의해 p = < 0.01).

[0445] 실시예 13: 메소텔린 CAR NK 세포의 생성 - 확장 상 동안의 형질도입

[0446] 상 1 (확장 상)의 제7일에 HSPC를 메소텔린 표적화된 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 렌티바이러스로 형질도입시켰다. 이 CAR의 발현을 EF1알파 프로모터를 사용하여 유도하였다. 이 구축물은 또한 동일한 프로모터로부터 발현되고 T2A 자기-절단 도메인에 의해 CAR 서열로부터 분리된 말단절단된 CD19 (tCD19) 세포외 도메인을 함유하였다. 0.5 ml의 배양 배지 중 1×10^6개의 세포/ml를 DPBS (깁코) 중 재조합 인간 피브로넥틴 단편 (타카라 바이오, 인크.; 레트로넥틴® 재조합 인간 피브로넥틴 단편) 5 μg/ml 및 0.8 μg/cm^2 표면적), 및 Notch 효능제 (델타$1^{ext-IgG}$, 2.5 μg/ml 및 0.4 μg/cm^2 표면적)의 용액으로 사전코팅된 24-웰 플레이트에 플레

이팅하였다. 배양 배지는 각각 50 ng/ml 재조합 인간 SCF (밀테니 비오텍), Flt-3 리간드 (밀테니 비오텍), TPO (밀테니 비오텍), 및 IL-6 (밀테니 비오텍), 및 10 ng/ml IL-3 (밀테니 비오텍)으로 보충된, 조혈 세포의 성장 및 확장에 적합한 배지 (스템스팬™ 혈청 무함유 확장 배지 II (SFEM II; 스템셀 테크놀로지스))를 포함하였다. 8 μg/ml 프로타민 술페이트 (밀리포어 시그마(Millipore Sigma))를 30의 감염의 다중도 (MOI)를 사용하여 렌티바이러스의 용액과 함께 첨가하였다. 30의 MOI로의 렌티바이러스의 제2 첨가를 3시간 후에 웰에 첨가하였다. 세포를 37℃에서 5% CO_2 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 제8일에, 세포를 SFEM II 배지 더하기 상기 5가지 성장 인자에 희석하여 세포 밀도 < 2 x 10^6개의 세포/ml를 유지함으로써 레트로넥틴® 및 델타$1^{ext-IgG}$로 사전 코팅된 보다 큰 부피 용기 (6-웰 플레이트) 내로 통과시켰다. 제14일에, 세포를 수집하고, 1 x 10^6개의 세포/ml의 밀도로 델타$1^{ext-IgG}$ 또는 레트로넥틴® 코팅이 없는 조직 배양 용기 (T25 조직 배양 플라스크) 내로 재플레이팅하였다. 분화 배양 배지는 5% 인간 혈소판 용해물 (hPL) (밀 크릭 라이프 사이언시스), 40 ng/ml rhIL-15 (페프로테크), 및 50 U/ml rhIL-2 (페프로테크)로 보충된 RPMI 1640 (깁코)을 포함하였다. 제21일에 용기 중의 배지의 50%를 신선한 분화 배지로 대체하면서, 세포를 추가의 총 14일 동안 배양하였다.

[0447] 제28일에, CAR NK 세포 제제를 수집하고, CAR 발현에 대해 유동 세포계측법에 의해 및 NOMO-1 AML 종양 표적 세포를 발현하는 2가지 상이한 녹색 형광 단백질- (GFP-)에 대한 시험관내 세포독성 검정에서 평가하였다. 모 NOMO-1 세포주는 CAR이 표적화된 메소텔린을 내인적으로 발현한다. 메소텔린의 넉아웃을 이 동일한 세포주에서 제조하였다 (NOMO-$1^{MSLN-/-}$).

[0448] CAR 발현을 유동 세포계측법에 의해 항-CD19 항체를 사용하여 세포 표면 상의 간접적 검출에 의해 평가하였다. 세포는 76% $CD56^+$ 및 27% $tCD19^+$였다 (도 21).

[0449] CAR 형질도입된 및 모의 형질도입된 대조군 NK 세포를 이펙터 세포로서 RPMI + 10% FBS + 40 ng/ml IL-15 + 50 U/ml IL-2에서 각각의 2가지 NOMO-1 표적 세포 (모 및 메소텔린 넉아웃)와의 공동-배양에 의해 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. E:T 비는 0.3 내지 20의 범위였으며, 검정은 24시간 동안 진행되었다. 인큐베이션의 종료시 세포를 DAPI 용액으로 표지하고, 유동 세포계측법에 의해 표적 세포의 GFP 형광 및 죽은 세포의 DAPI 형광에 대해 분석하여 % 특이적 세포 사멸을 결정하였다.

[0450] 결과는 메소텔린 CAR-NK 세포가 NOMO-$1^{MSLN-/-}$ 세포에 비해 모 NOMO-1 세포를 살해하는데 있어서 유의하고 특이적인 증가 (최대 55%)를 입증하였음을 나타내었다. 양쪽 NOMO-1 세포주에 대해 대조군 NK 세포에서 유사한 저-수준 살해가 관찰되었다 (도 22).

[0451] 실시예 14: 메소텔린 CAR NK 세포의 생성 - NK 세포 분화 후의 형질도입

[0452] 본 실시예에서 세포의 $CD34^+$ 풍부화된 비-면역학적으로 매칭된 풀을 상 1 (확장) 및 상 2 (분화) 둘 다를 통해 상기와 같이 프로세싱하였다. 완전한 분화에 이어서 NK 세포를 CAR 구축물로 형질도입시켰다.

[0453] 특히, 분화 상 동안 상 2의 제23일에, 벌크한 세포를 면역자기 마이크로비드 기반 칼럼 단리 프로토콜 (CD56 마이크로비드, 인간, 밀테니 비오텍)을 사용하여 인간 $CD56^+$ NK 세포에 대해 풍부화하였다. 풍부화된 NK 세포 (> 96% $CD56^+$)를 실시예 12에 기재된 동일한 렌티바이러스로 형질도입시켰다. 2 ml 분화 배양 배지 중 1 x 10^6개의 세포/ml를 40의 MOI를 사용하여 8 μg/ml 프로타민 술페이트 및 렌티바이러스와 함께 6-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 세포를 37 ℃에서 5 % CO_2 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 제24일에, 배지 부피의 절반을 신선한 배양 배지로 대체하였다.

[0454] 제27일에, NK 세포 제제를 수집하고, CAR 발현에 대해 유동 세포계측법에 의해 및 실시예 13에 기재된 모 NOMO-1 및 NOMO-$1^{MSLN-/-}$ 표적 세포에 대한 시험관내 세포독성 검정에서 평가하였다. CAR 발현을 유동 세포계측법에 의해 항-CD19 항체를 사용하여 세포 표면 상의 간접적 검출에 의해 평가하였다. 세포는 > 99 % $CD56^+$ 및 40 % $tCD19^+$였다 (도 23).

[0455] CAR 형질도입된 및 모의 형질도입된 대조군 NK 세포를 이펙터 세포로서 RPMI + 10 % FBS + 40 ng/ml IL-15 + 50 U/ml IL-2에서 각각의 2가지 NOMO-1 표적 세포 (모 및 메소텔린 넉아웃)와의 공동-배양에 의해 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. E:T 비는 0.3 내지 10의 범위였으며, 검정은 24시간 동안 진행되었다. 인큐베이

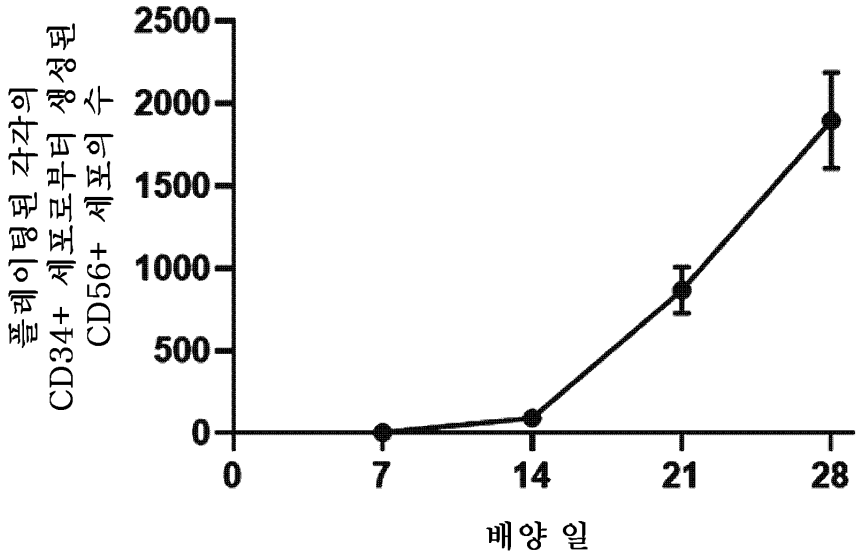
션의 종료시 세포를 DAPI로 표지하고, 유동 세포계측법에 의해 표적 세포의 GFP 형광 및 죽은 세포의 DAPI 형광에 대해 분석하여 % 특이적 세포 사멸을 결정하였다.

[0456] 결과는 메소텔린 CAR-NK 세포가 NOMO-1$^{MSLN-/-}$ 표적 세포에 비해 모 NOMO-1 표적 세포를 살해하는데 있어서 유의하고 특이적인 증가 (최대 27 %)를 입증하였음을 나타내었다. 양쪽 NOMO-1 표적 세포주에 대해 대조군 NK 세포에서 유사한 저-수준 살해가 관찰되었다 (도 24).

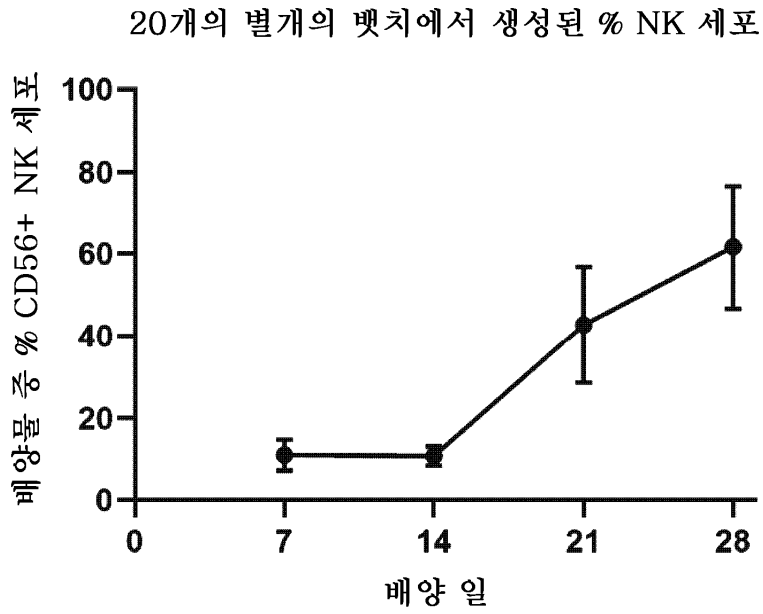
[0457] 독점적 소유 또는 특권이 청구된 본 발명의 실시양태는 하기와 같이 정의된다.

도면

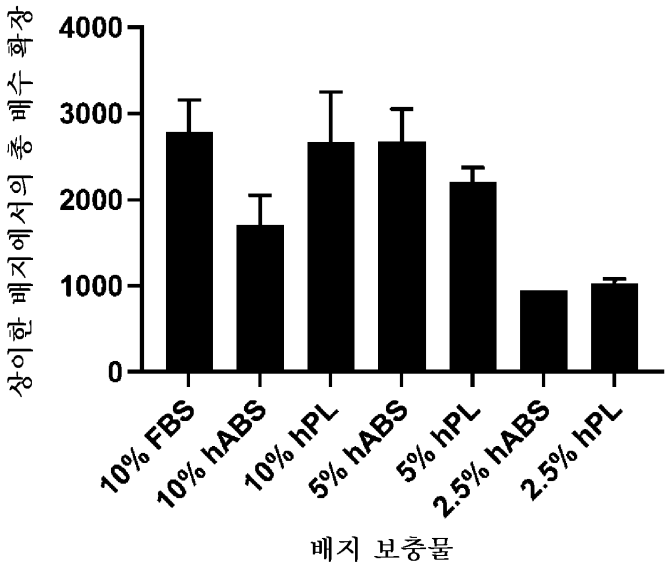
도면1a



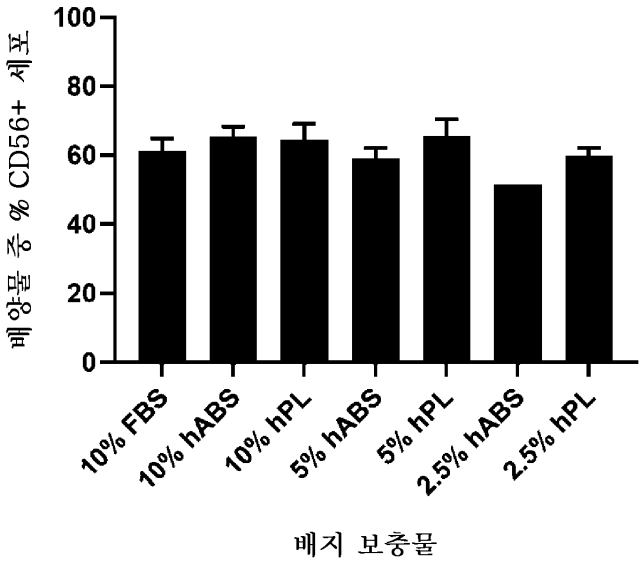
도면1b



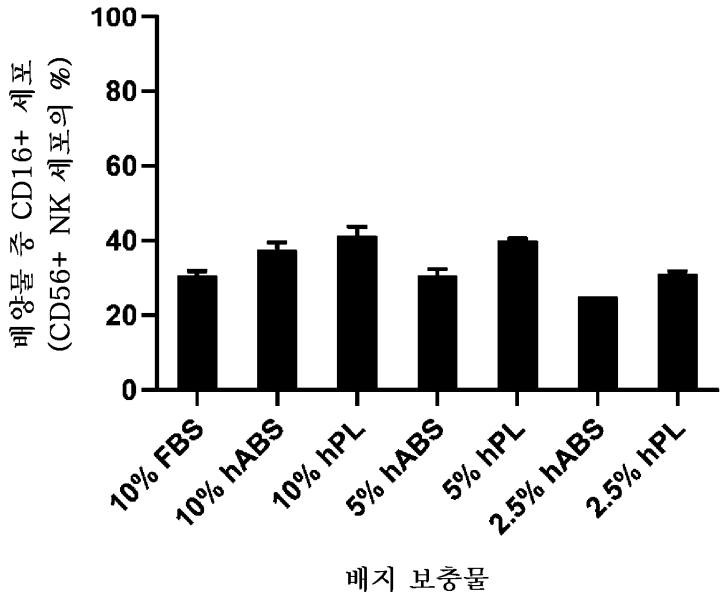
도면2


상이한 배지에서의 총 배수 확장
4000
3000
2000
1000
0
10% FBS
10% hABS
10% hPL
5% hABS
5% hPL
2.5% hABS
2.5% hPL
배지 보충물

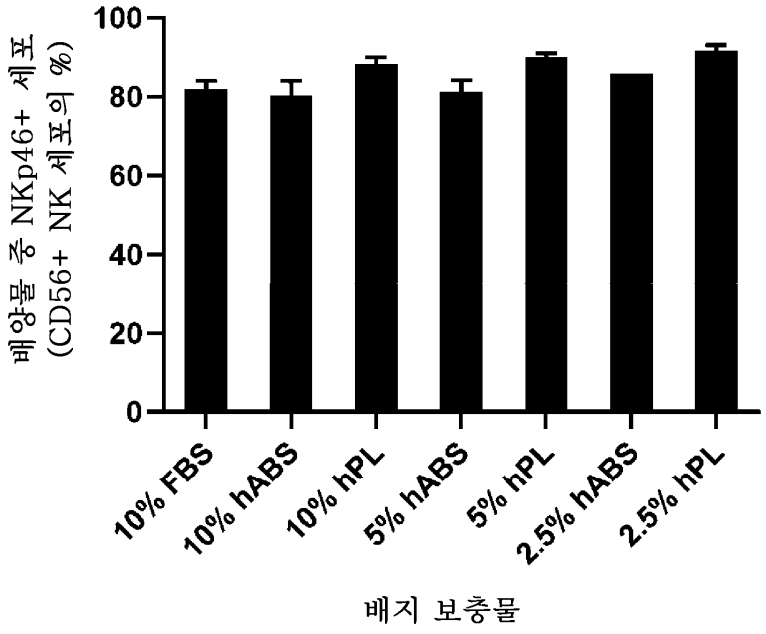
도면3


배양물 중 % CD56+ 세포
100
80
60
40
20
0
10% FBS
10% hABS
10% hPL
5% hABS
5% hPL
2.5% hABS
2.5% hPL
배지 보충물

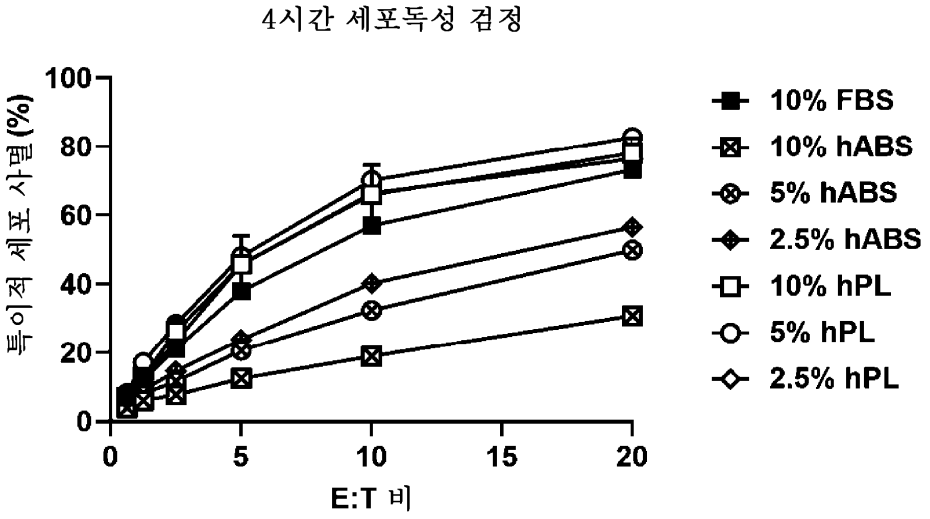
도면4


배양물 중 CD16+ 세포
(CD56+ NK 세포의 %)
100
80
60
40
20
0
10% FBS
10% hABS
10% hPL
5% hABS
5% hPL
2.5% hABS
2.5% hPL
배지 보충물

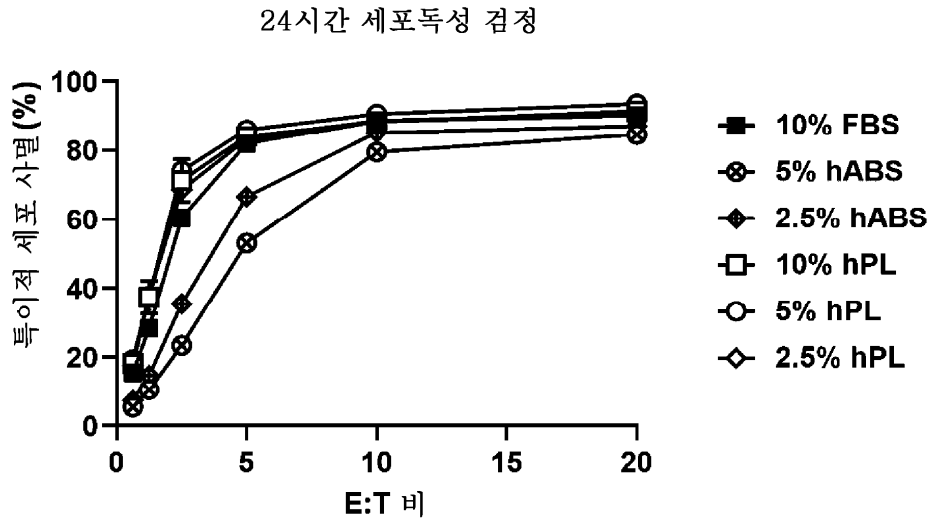
도면5


배양물 중 NKp46+ 세포
(CD56+ NK 세포의 %)
100
80
60
40
20
0
10% FBS
10% hABS
10% hPL
5% hABS
5% hPL
2.5% hABS
2.5% hPL
배지 보충물

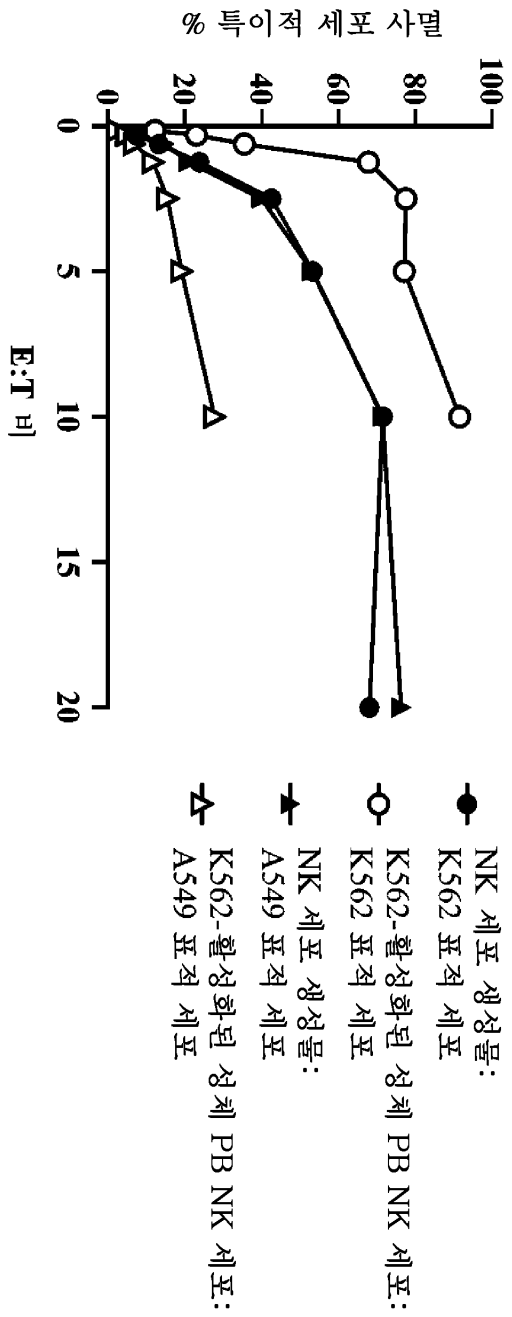
도면6


4시간 세포독성 검정
특이적 세포 사멸 (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
E:T 비
10% FBS
10% hABS
5% hABS
2.5% hABS
10% hPL
5% hPL
2.5% hPL

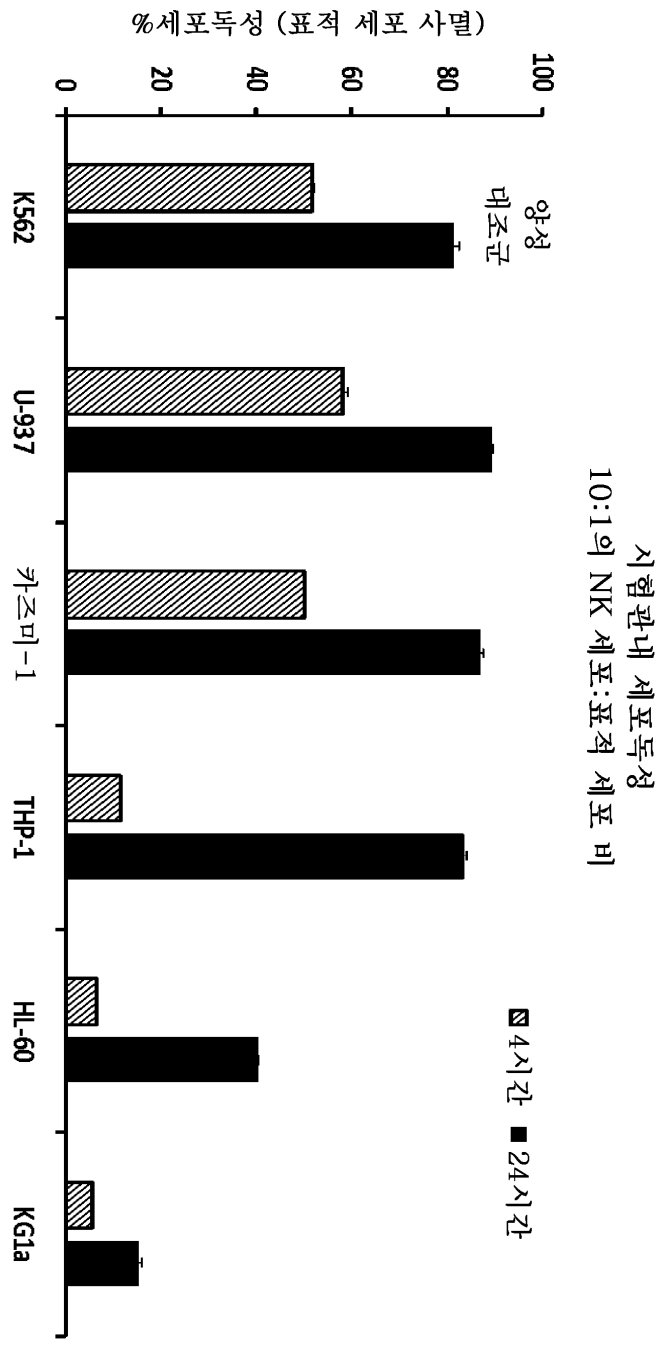
도면7


24시간 세포독성 검정
특이적 세포 사멸 (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
E:T 비
10% FBS
5% hABS
2.5% hABS
10% hPL
5% hPL
2.5% hPL

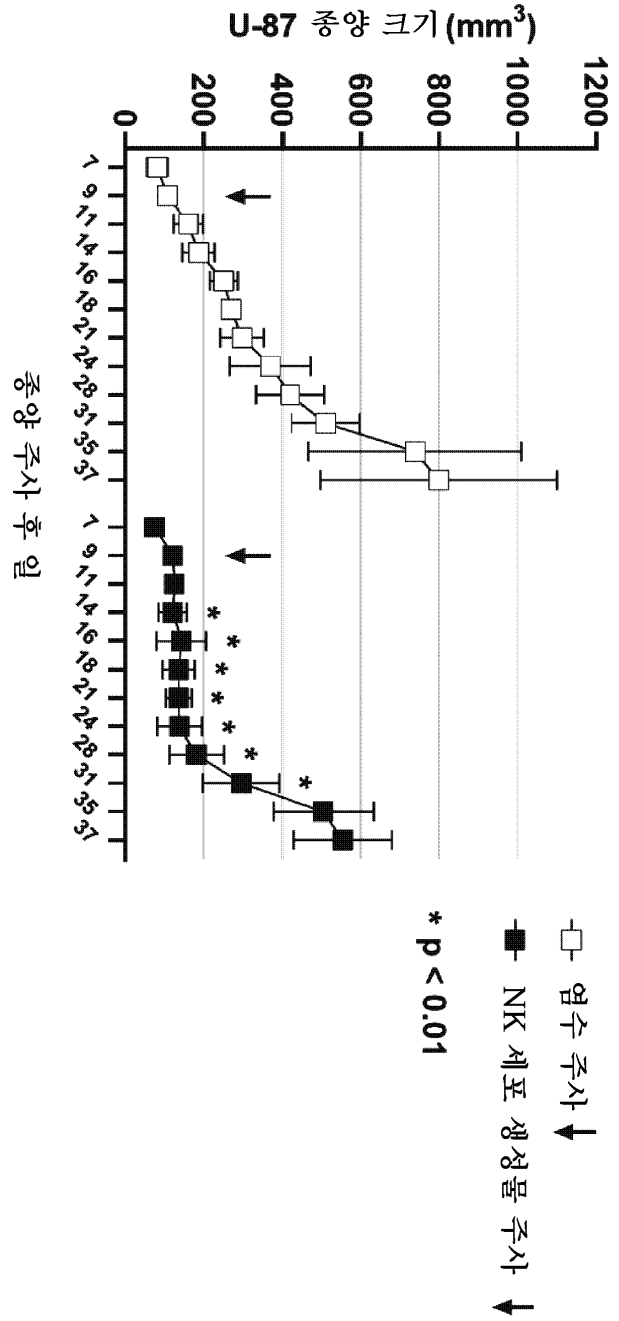
도면8


% 특이적 세포 사멸
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
E:T 비
NK 세포 생성물:
K562 표적 세포
K562-활성화된 성체 PB NK 세포:
K562 표적 세포
NK 세포 생성물:
A549 표적 세포
K562-활성화된 성체 PB NK 세포:
A549 표적 세포

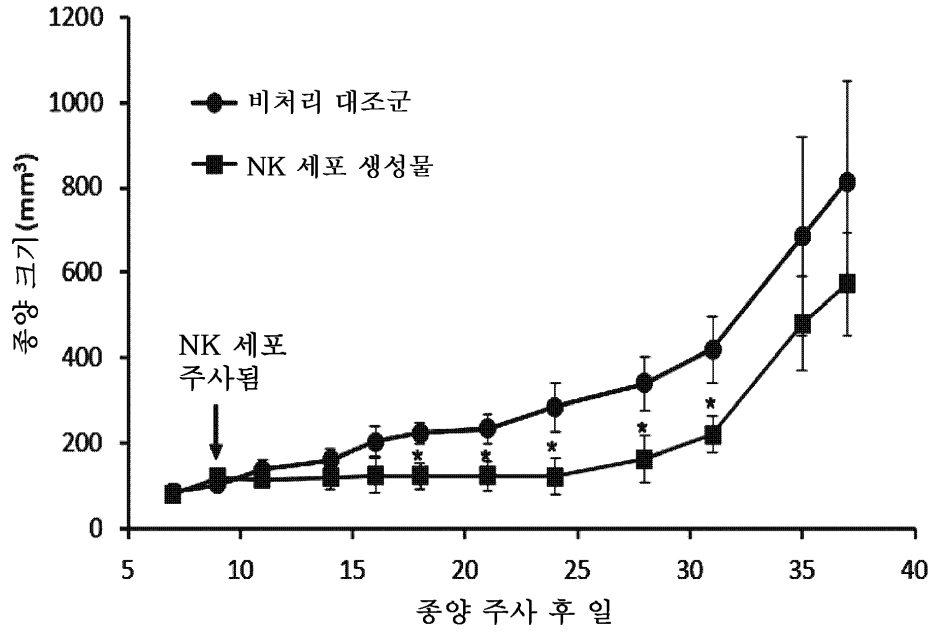
도면9


시험관내 세포독성
10:1의 NK 세포:표적 세포 비
%세포독성 (표적 세포 사멸)
0
20
40
60
80
100
양성 대조군
K562
U-937
카즈미-1
THP-1
HL-60
KG1a
4시간
24시간

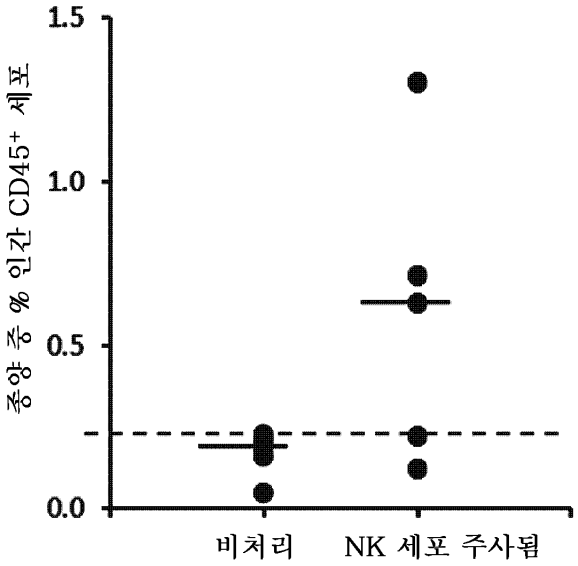
도면10


U-87 종양 크기 (mm3)
0
200
400
600
800
1000
1200
종양 주사 후 일
염수 주사
NK 세포 생성물 주사
* p < 0.01

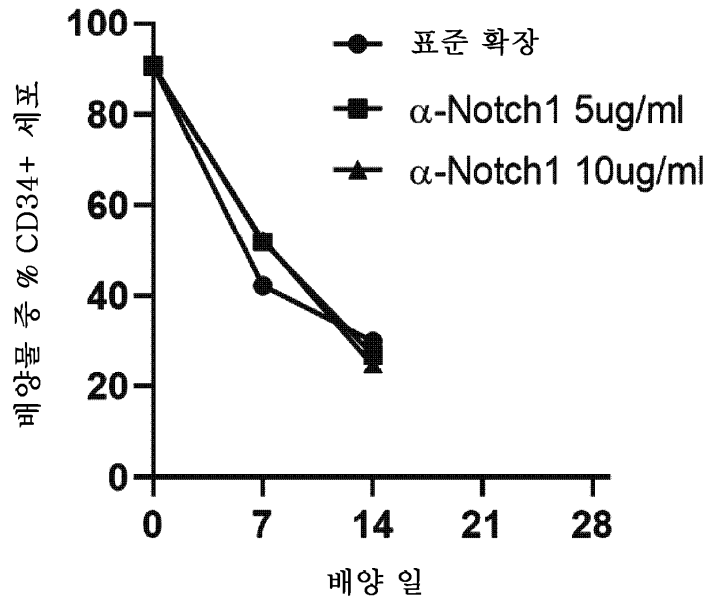
도면11a


1200
1000
800
600
400
200
0
종양 크기(mm³)
비처리 대조군
NK 세포 생성물
NK 세포
주사됨
5
10
15
20
25
30
35
40
종양 주사 후 일

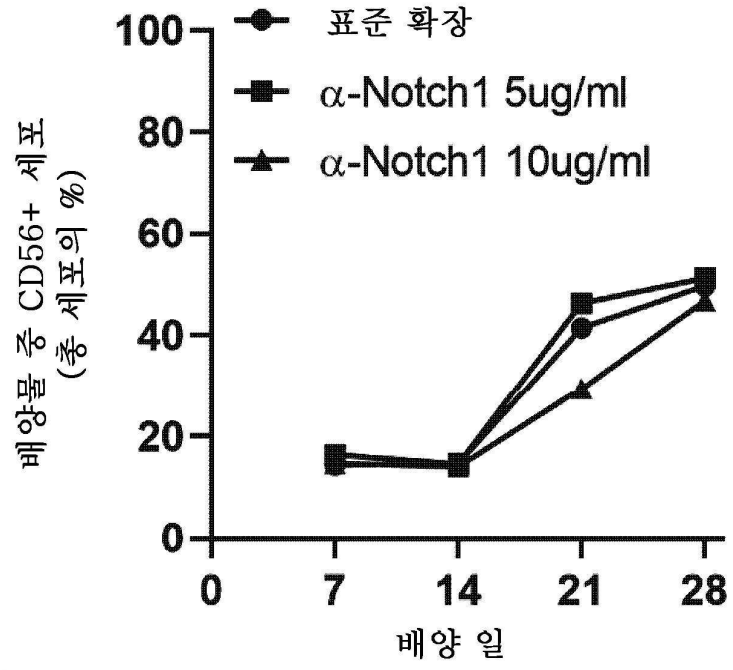
도면11b


1.5
1.0
0.5
0.0
종양 중 % 인간 CD45⁺ 세포
비처리
NK 세포 주사됨

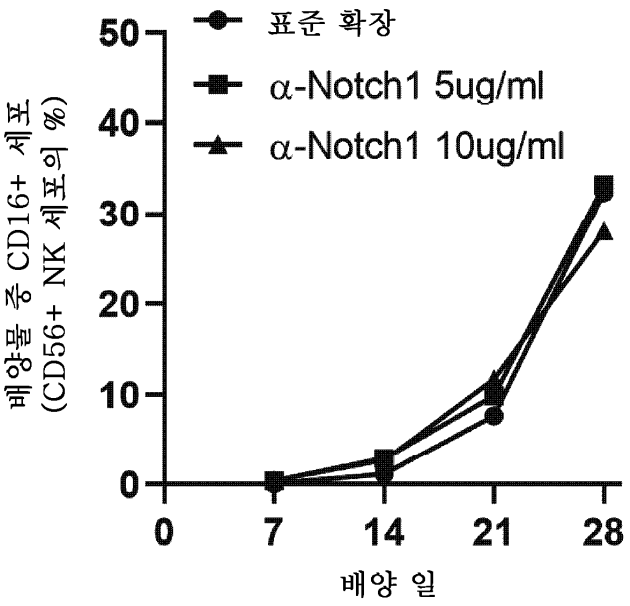
도면12a


100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
배양물 중 % CD34+ 세포
배양 일
표준 확장
α-Notch1 5ug/ml
α-Notch1 10ug/ml

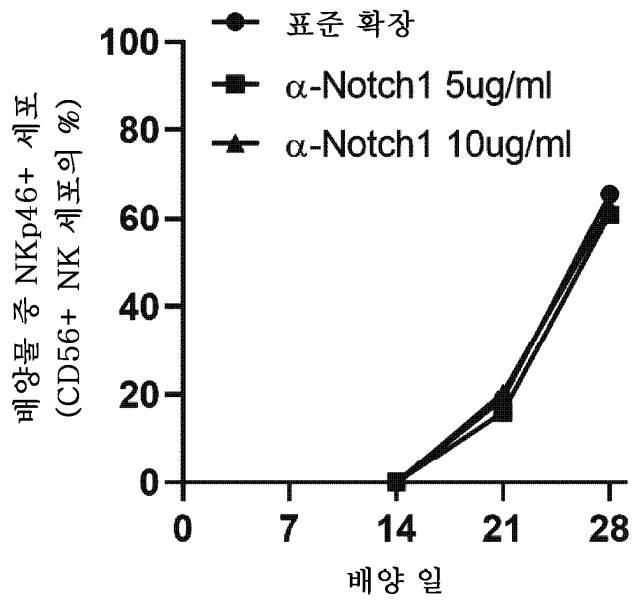
도면12b


100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
배양물 중 CD56+ 세포
(총 세포의 %)
배양 일
표준 확장
α-Notch1 5ug/ml
α-Notch1 10ug/ml

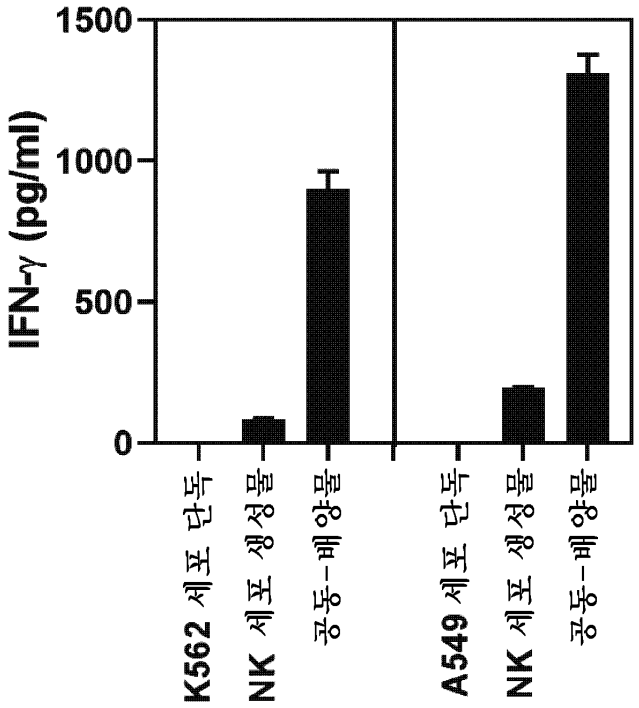
도면12c


표준 확장
α-Notch1 5ug/ml
α-Notch1 10ug/ml
배양물 중 CD16+ 세포
(CD56+ NK 세포의 %)
50
40
30
20
10
0
0
7
14
21
28
배양 일

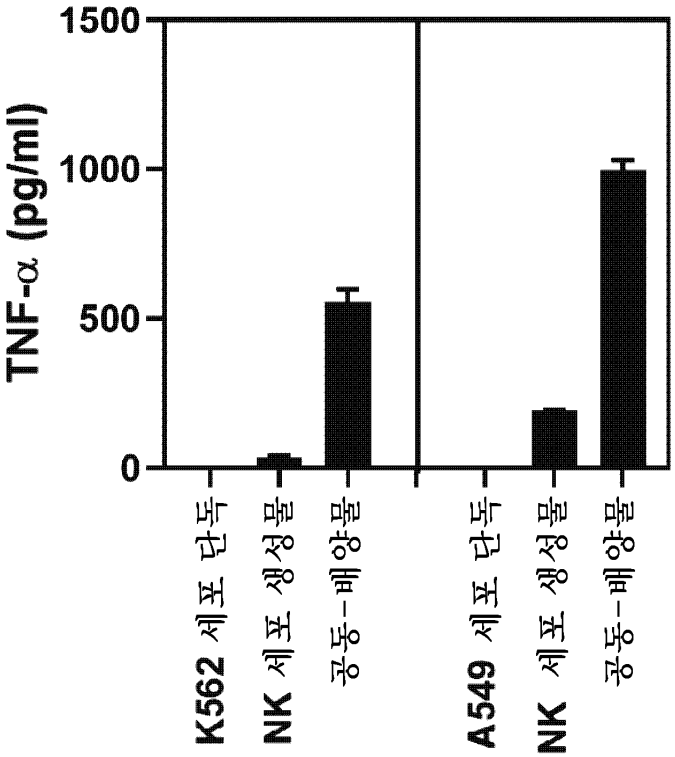
도면12d


표준 확장
α-Notch1 5ug/ml
α-Notch1 10ug/ml
배양물 중 NKp46+ 세포
(CD56+ NK 세포의 %)
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
배양 일

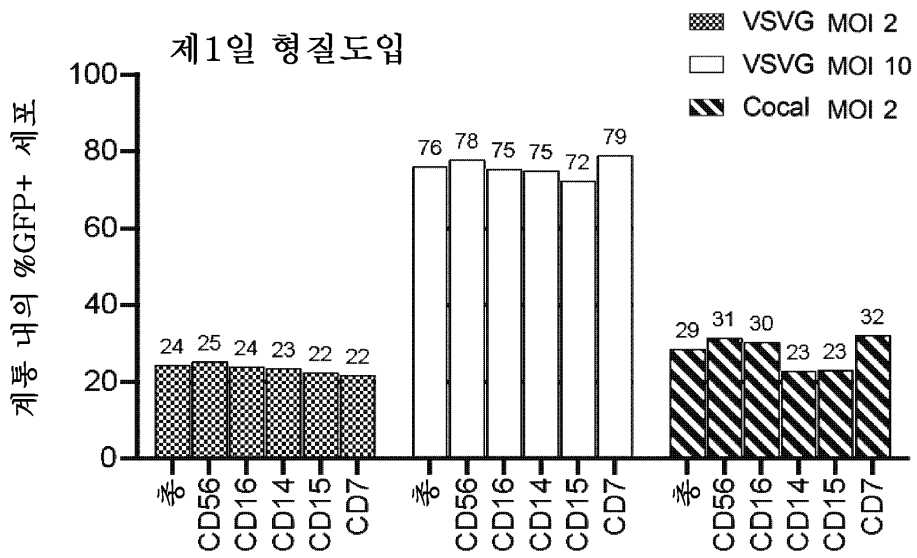
도면13a


1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/ml)
K562 세포 단독
NK 세포 생성물
공동-배양물
A549 세포 단독
NK 세포 생성물
공동-배양물

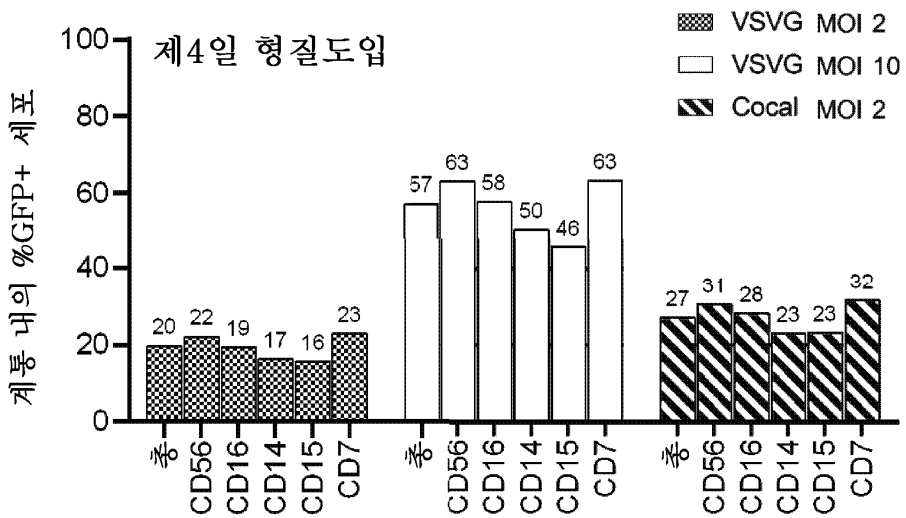
도면13b


1500
1000
500
0
TNF-α (pg/ml)
K562 세포 단독
NK 세포 생성물
공동-배양물
A549 세포 단독
NK 세포 생성물
공동-배양물

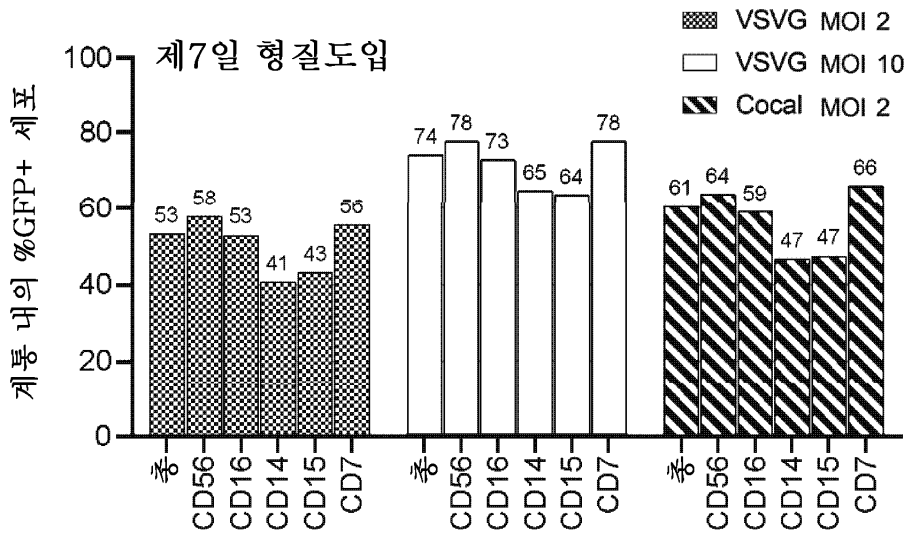
도면14a


제1일 형질도입
VSVG MOI 2
VSVG MOI 10
Cocal MOI 2
계통 내의 %GFP+ 세포
100
80
60
40
20
0
24 25 24 23 22 22
76 78 75 75 72 79
29 31 30 23 23 32
총
CD56
CD16
CD14
CD15
CD7

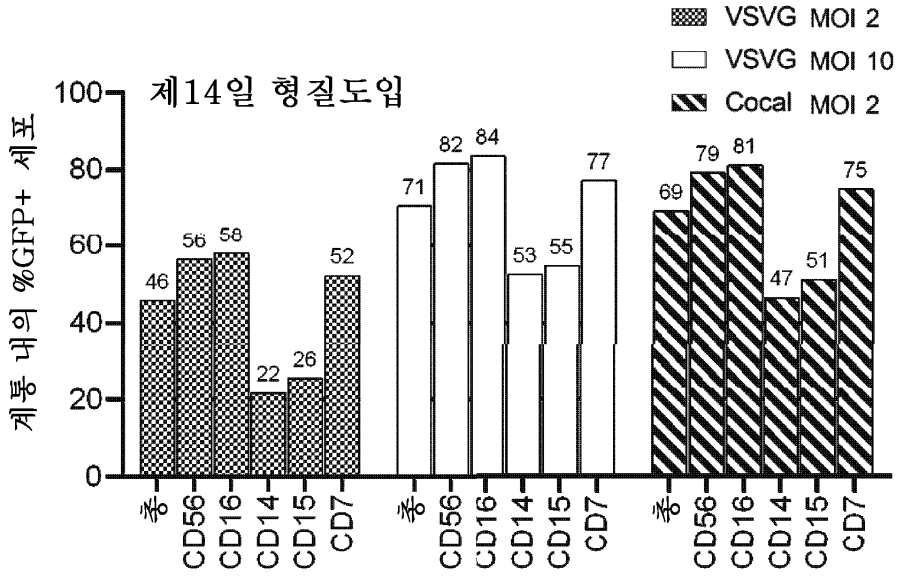
도면14b


제4일 형질도입
VSVG MOI 2
VSVG MOI 10
Cocal MOI 2
계통 내의 %GFP+ 세포
100
80
60
40
20
0
20 22 19 17 16 23
57 63 58 50 46 63
27 31 28 23 23 32
총
CD56
CD16
CD14
CD15
CD7

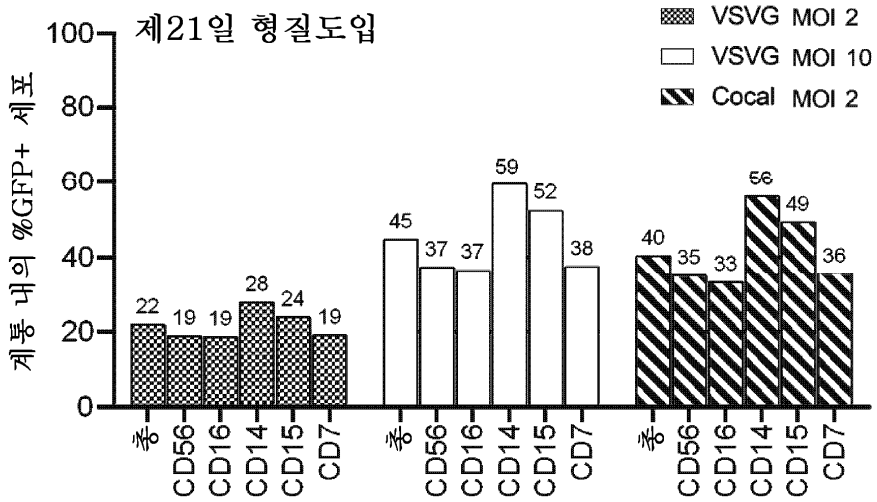
도면14c


제7일 형질도입
VSVG MOI 2
VSVG MOI 10
Cocal MOI 2
계통 내의 %GFP+ 세포
100
80
60
40
20
0
53 58 53 41 43 55
74 78 73 65 64 78
61 64 59 47 47 66
총
CD56
CD16
CD14
CD15
CD7

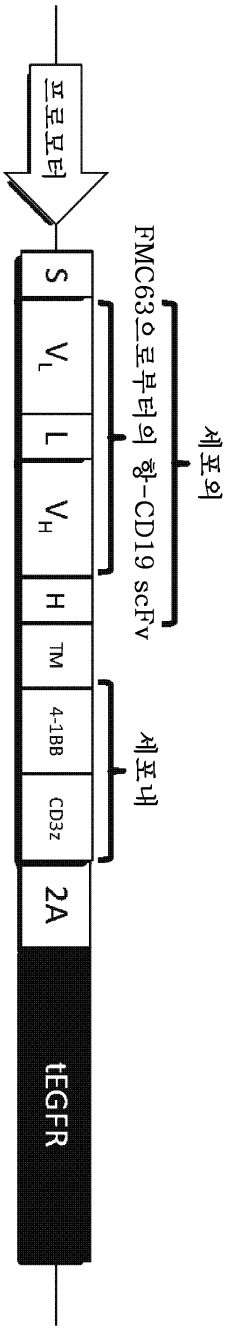
도면14d


제14일 형질도입
VSVG MOI 2
VSVG MOI 10
Cocal MOI 2
계통 내의 %GFP+ 세포
100
80
60
40
20
0
46 56 58 22 26 52
71 82 84 53 55 77
69 79 81 47 51 75
총
CD56
CD16
CD14
CD15
CD7

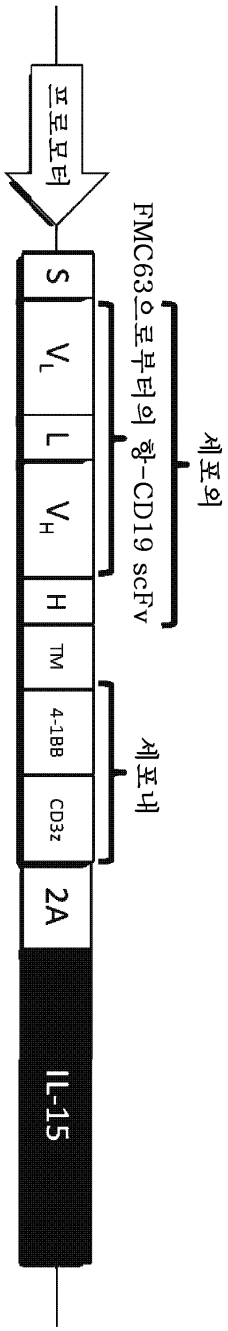
도면14e


제21일 형질도입
VSVG MOI 2
VSVG MOI 10
Cocal MOI 2
계통 내의 %GFP+ 세포
100
80
60
40
20
0
22
19
19
28
24
19
45
37
37
59
52
38
40
35
33
56
49
36
총
CD56
CD16
CD14
CD15
CD7

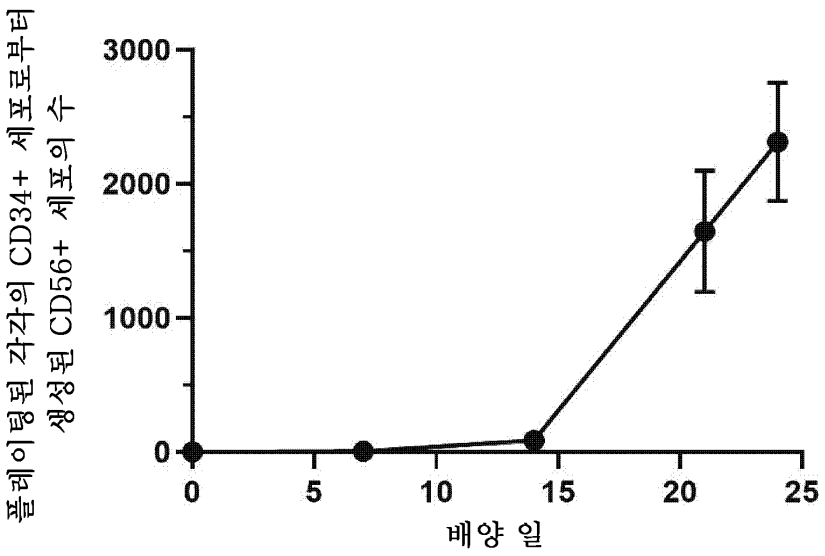
도면15


프로모터
S
VL
L
VH
H
TM
4-1BB
CD3z
2A
tEGFR
FMC63으로부터의 항-CD19 scFv
세포외
세포내

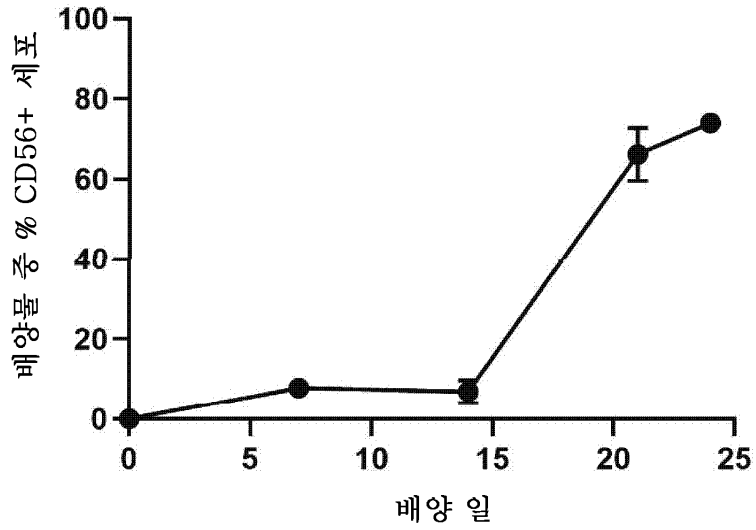
도면16


프로모터
S
VL
L
VH
H
TM
4-1BB
CD3z
2A
IL-15
FMC63으로부터의 항-CD19 scFv
세포외
세포내

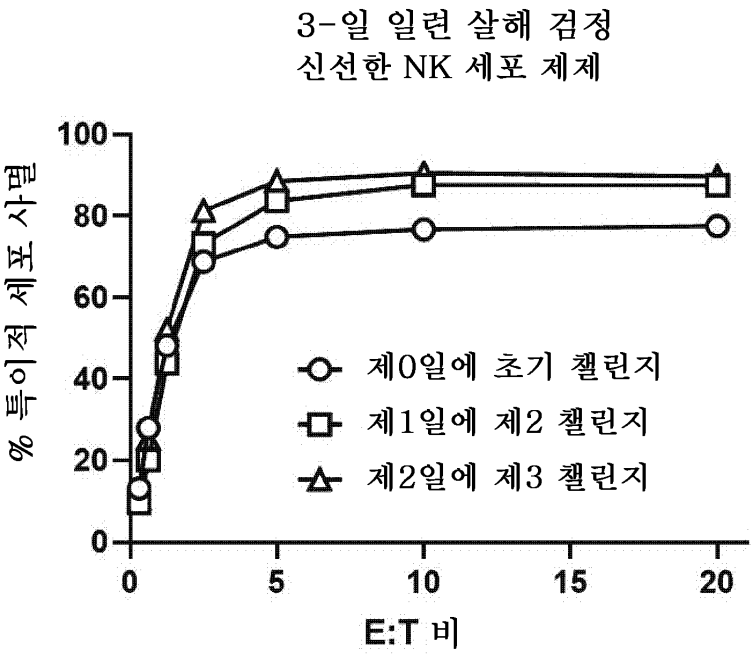
도면17a


플레이팅된 각각의 CD34+ 세포로부터
생성된 CD56+ 세포의 수
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
배양 일

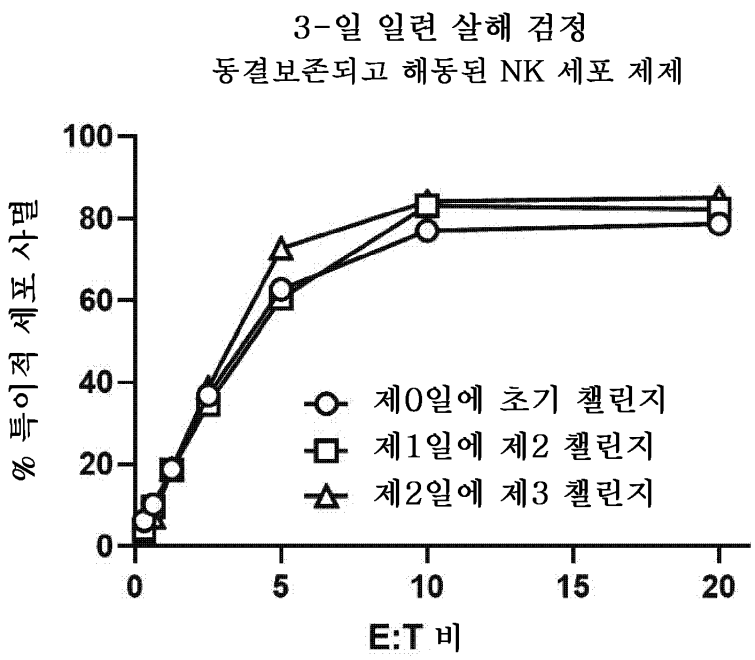
도면17b


배양물 중 % CD56+ 세포
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
배양 일

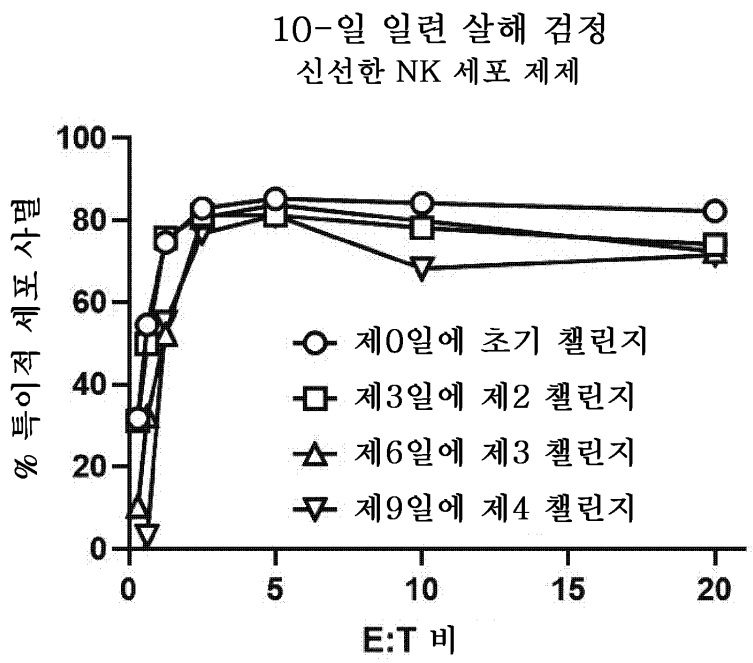
도면18a


3-일 일련 살해 검정
신선한 NK 세포 제제
% 특이적 세포 사멸
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
E:T 비
제0일에 초기 챌린지
제1일에 제2 챌린지
제2일에 제3 챌린지

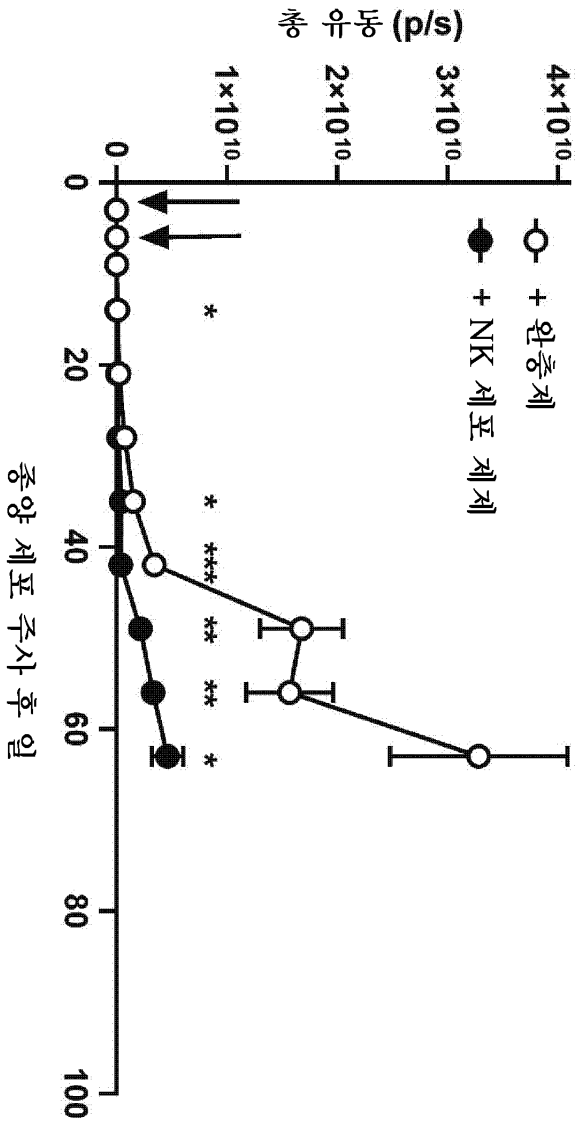
도면18b


3-일 일련 살해 검정
동결보존되고 해동된 NK 세포 제제
% 특이적 세포 사멸
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
E:T 비
제0일에 초기 챌린지
제1일에 제2 챌린지
제2일에 제3 챌린지

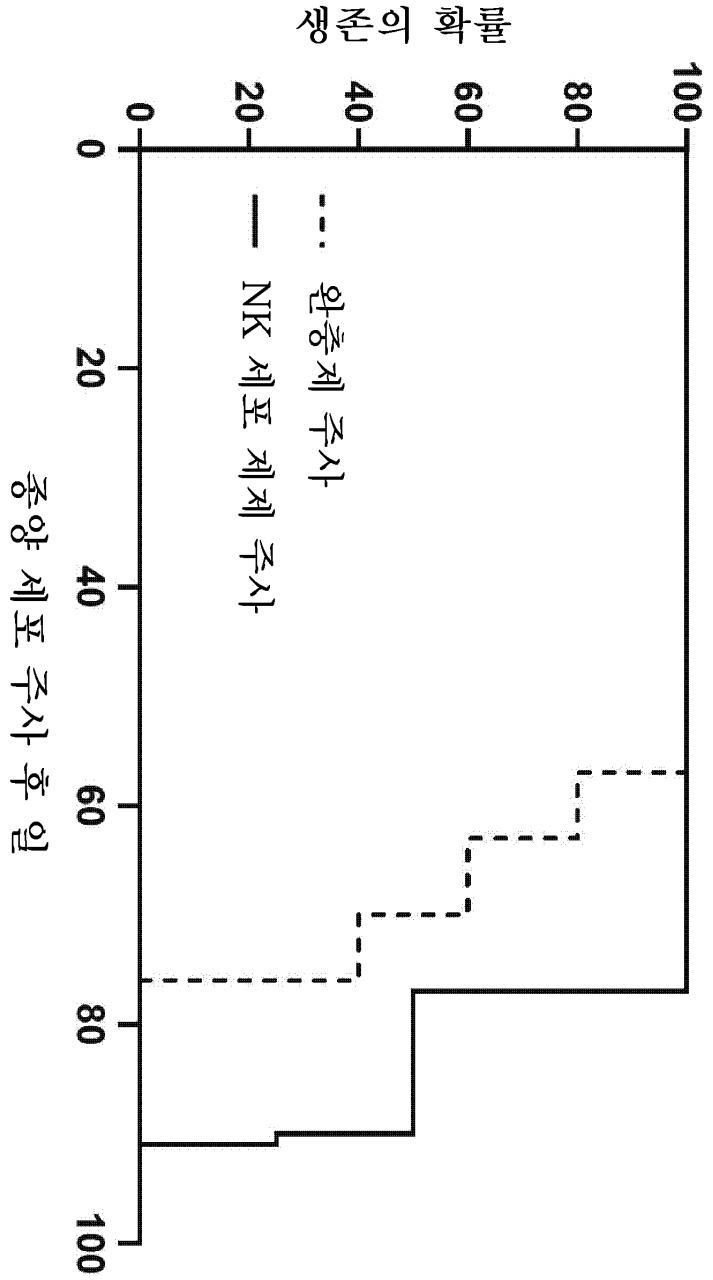
도면18c


10-일 일련 살해 검정
신선한 NK 세포 제제
% 특이적 세포 사멸
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
E:T 비
제0일에 초기 챌린지
제3일에 제2 챌린지
제6일에 제3 챌린지
제9일에 제4 챌린지

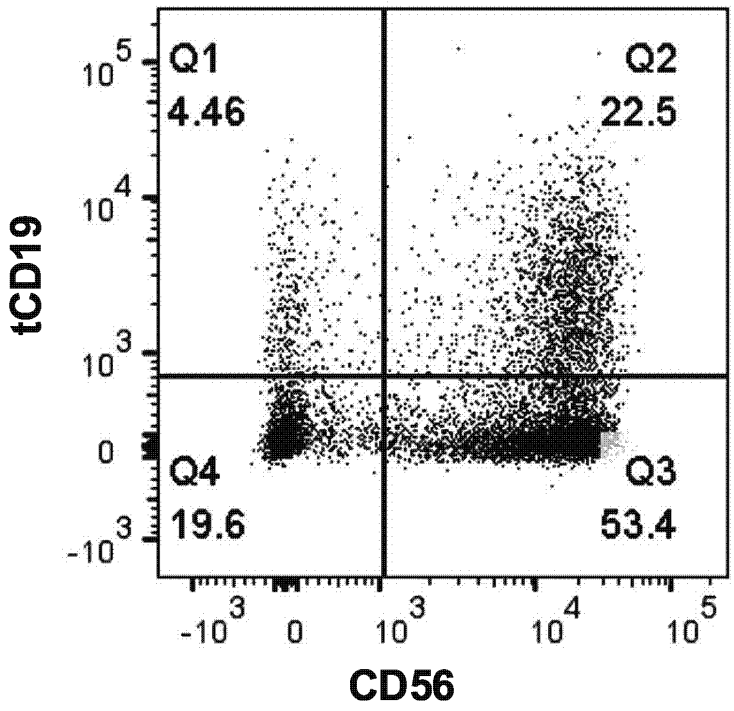
도면19


총 유동 (p/s)
4×10¹⁰
3×10¹⁰
2×10¹⁰
1×10¹⁰
0
+ 완충제
+ NK 세포 제제
종양 세포 주사 후 일
0
20
40
60
80
100
*
*
***
**
**
*

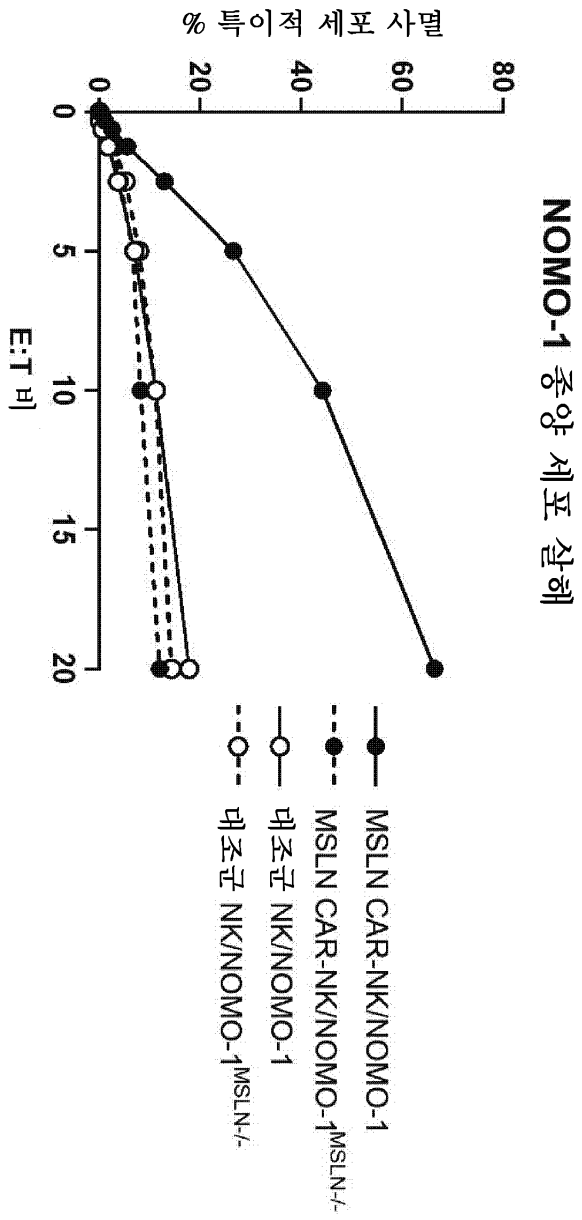
도면20



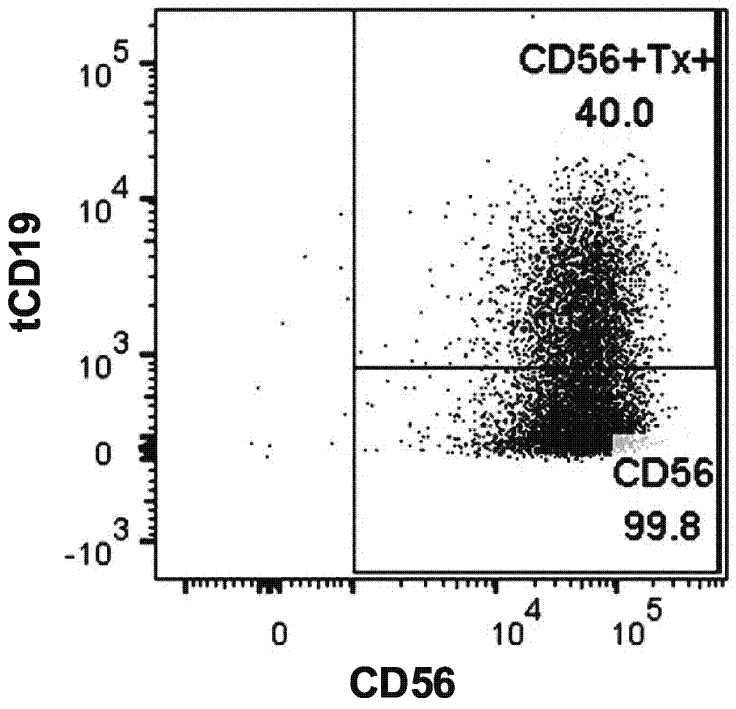
도면21


Q1
4.46
Q2
22.5
Q4
19.6
Q3
53.4
tCD19
CD56
10^5
10^4
10^3
0
-10^3
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

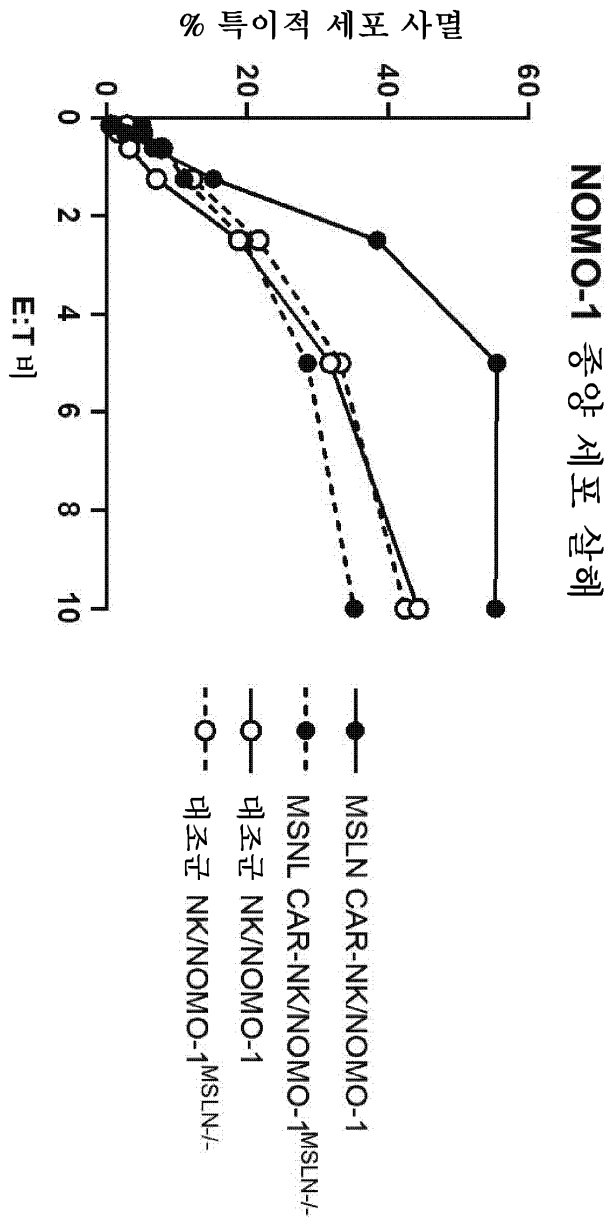
도면22


NOMO-1 종양 세포 살해
% 특이적 세포 사멸
0
20
40
60
80
E:T 비
0
5
10
15
20
MSLN CAR-NK/NOMO-1
MSLN CAR-NK/NOMO-1MSLN-/-
대조군 NK/NOMO-1
대조군 NK/NOMO-1MSLN-/-

도면23



도면24



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Deverra Therapeutics Inc.

Delaney, Colleen

Stoltzman, Carrie

Dam, Elizabeth

Prieve, Mary

<120> NK CELL COMPOSITIONS AND PREPARATIONS FOR IMMUNOTHERAPY AND METHODS FOR THEIR PRODUCTION

<130> DVRA-1-72246

<150> US 62/880044

<151> 2019-07-29

<150> US 62/892779

<151> 2019-08-28

<150> US 62/960507

<151> 2020-01-13

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Val Thr Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 7

<211> 235

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 7

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr

20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser

35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala
50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
65 70 75 80
Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
85 90 95
Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
100 105 110
Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
130 135 140
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
145 150 155 160
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
165 170 175
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
195 200 205
Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
210 215 220
Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
225 230 235

<210> 8
<211> 247
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Glu Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met
1 5 10 15

Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Lys Pro Gln Ala Pro
20 25 30
Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala Glu Leu Gly Gln Lys
35 40 45
Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val Ser Gln Gly Cys Ser
50 55 60
Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro Gln Pro Thr Phe Val
65 70 75 80

Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr Trp Asp Glu Lys Leu
85 90 95
Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Val Arg Asp Thr Asn Asn Lys Tyr
100 105 110
Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe
115 120 125
Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro
130 135 140

Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr
145 150 155 160
Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu
165 170 175
Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala
180 185 190
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Pro
195 200 205

Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys
210 215 220
Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro
225 230 235 240
Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
245

<210> 9

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro
1 5 10 15

Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly
20 25 30

Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
35 40 45

Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile
50 55 60

Thr Leu Ile Cys Tyr
65

<210> 10

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys

100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro

130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile

165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro

195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

210 215 220

<210> 11

<211> 164

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 12

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Met Lys Trp Lys Val Ser Val Leu Ala Cys Ile Leu His Val Arg Phe

1 5 10 15

Pro Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala

35 40 45

Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn

50 55 60

Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met

85 90 95

Gly Gly Lys Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala

100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys

115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Asp Ser

130 135 140

His Phe Gln Ala Val Gln Phe Gly Asn Arg Arg Glu Arg Glu Gly Ser

145 150 155 160

Glu Leu Thr Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ala Arg Pro Lys Ala Cys Arg

165 170 175

His Lys Lys Pro Leu Ser Leu Pro Ala Ala Val Ser

180 185

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp

1 5 10 15

Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln

50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu

65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Thr Leu Ala Pro

100 105 110

Arg

<210> 14

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Asn Phe Phe Ser Val Gln
1 5 10 15

Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val
20 25 30

Asp Ser Asn Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu
35 40 45

Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser Asp Val
50 55 60

Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg
65 70 75 80

Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val
85 90 95

Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe
100 105 110

Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg
115 120 125

Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr
130 135 140

Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu Val Val Val Ala Gly Val
145 150 155 160

Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val Ala Leu Cys Val Ile Trp
165 170 175

Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met
180 185 190

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala

195 200 205

Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro

210 215

<210> 15

<211> 767

<212

> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atgggaaaca gctgttacaa catagtagcc actctgttgc tggtcctcaa ctttgagagg 60

acaagatcat tgcaggatcc ttgtagtaac tgcccagctg gtacattctg tgataataac 120

aggaatcaga tttgcagtcc ctgtcctcca aatagtttct ccagcgcagg tggacaaagg 180

acctgtgaca tatgcaggca gtgtaaaggt gttttcagga ccaggaagga gtgttcctcc 240

accagcaatg cagagtgtga ctgcactcca gggtttcact gcctgggggc aggatgcagc 300

atgtgtgaac ggattgtaaa caaggtcaag aactgacaaa aaaaggttgt aaagactgtt 360

gctttgggac atttaacgat cagaaacgtg gcatctgtcg accctggaca aactgttctt 420

tggatggaaa gtctgtgctt gtgaatggga cgaaggagag ggacgtggtc tgtggaccat 480

ctccagccga cctctctccg ggagcatcct ctgtgacccc gcctgcccct gcgagagagc 540

caggacactc tccgcagatc atctccttct ttcttgcgct gacgtcgact gcgttgctct 600

tcctgctgtt cttcctcacg ctccgtttct ctgttgttaa acggggcaga aagaaactcc 660

tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag gaagatggct 720

gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgtga 767

<210> 16

<211> 601

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

atgaagtcag gcctctggta tttctttctc ttctgcttgc gcattaaagt tttaacagga 60

gaaatcaatg gttctgccaa ttatgagatg tttatatttc acaacggagg tgtacaaatt 120

ttatgcaaat atcctgacat tgtccagcaa tttaaaatgc agttgctgaa aaggggggca 180

aatactctgc gatctcacta agacaaaagg aagtggaaac acagtgtcca ttaagagtct 240

gaaattctgc cattctcagt tatccaacaa cagtgtctct ttttttctac aaccttggac 300

cattctcatg ccaactatta cttctgcaac ctatcaattt ttgatcctcc tccttttaaa 360

gtaactctta caggaggata tttgcatatt tatgaaatca caactttgtt gccagctgaa 420

gttctggtta cccataggat gtgcagcctt tgttgtagtc tgcattttgg gatgcatact 480

tatttgttgg cttacaaaaa agaagtattc atccagtgtg cacgacccta acggtgaata 540

catgttcatg agagcagtga acacagccaa aaaatctaga ctcacagatg tgaccctata 600

a 601

<210> 17

<211> 282

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atgatccatc tgggtcacat cctcttcctg cttttgctcc cagtggctgc agctcagacg 60

accccaggag agagatcatc actccctgcc ttttaccctg gcacttcagg ctcctgttcc 120

ggatgtgggt ccctctctct gccgctcctg gcaggcctcg tggctgctga tgcggtggca 180

tcgctgctca tcgtgggggc ggtgttcctg tgcgcacgcc cacgccgcag ccccgcccaa 240

gaagatggca aagtctacat caacatgcca ggcaggggct ga 282

<210> 18

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 19

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val

```
            20                  25                  30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
        35                  40                  45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
    50                  55                  60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65                  70                  75                  80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
                85                  90                  95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
            100                 105                 110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
        115                 120                 125
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
    130                 135                 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145                 150                 155                 160
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
                165                 170                 175
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
            180                 185                 190
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
        195                 200                 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
    210                 215                 220
Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225                 230                 235                 240
Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
                245                 250                 255
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
            260                 265                 270
```

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 20

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1 5 10 15

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
35 40 45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
50 55 60

Leu Ile Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65 70 75 80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
85 90 95

Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Ile Gly Gly Tyr Leu
115 120 125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
130 135 140

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145 150 155 160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
165 170 175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
180 185 190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu

195

<210> 21

<211> 485

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro

20 25 30

Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser

35 40 45

Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly

65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr

85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr

100 105 110

Phe Cys Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr

145 150 155 160

Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val

165 170 175

Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln

180 185 190

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr
195 200 205
Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
210 215 220

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp
225 230 235 240
Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly
245 250 255
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
260 265 270
Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
275 280 285

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
290 295 300
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
305 310 315 320
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
325 330 335
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
340 345 350

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
355 360 365
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro
370 375 380
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
385 390 395 400
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
405 410 415

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
420 425 430
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly

435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
450 455 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 22

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala

145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu

165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu

180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser

195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln

210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly

260 265 270

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

275 280 285

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile

290 295 300

Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

305 310 315 320

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser

325 330 335

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

340 345 350

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln

355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

370 375 380

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

385 390 395 400

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
405 410 415
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
420 425 430

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
435 440 445
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu
450 455 460

<210> 23
<211> 491
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 23

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Lys Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
35 40 45
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Leu Ser Pro Glu Met Arg Leu Glu
50 55 60
Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Gly Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Asp
65 70 75 80
Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95
Leu His Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Met Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Phe Gly Asn Tyr Gly Asp Tyr Tyr Ala Met
115 120 125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu

145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr

165 170 175

Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys

180 185 190

Asn Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu

195 200 205

Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

210 215 220

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val

225 230 235 240

Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Leu

245 250 255

Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

260 265 270

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

275 280 285

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

290 295 300

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

305 310 315 320

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

325 330 335

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser

370 375 380

Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly

450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 24

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro

20 25 30

Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser

35 40 45

Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly

65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr

85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
100 105 110
Phe Cys Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp
115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val
165 170 175
Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln
180 185 190
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr
195 200 205
Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
210 215 220

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp
225 230 235 240
Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly
245 250 255
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335
Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380
Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 25
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 26
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
Arg Ala Asp
115

<210> 27

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg Ser Asp Pro
115

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Thr Val Tyr Ala Asp Ala Val Lys

50 55 60

Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Gln Asn Trp Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

Gln Ile Met Leu Thr Gln Gln Ala Glu Ser Leu Trp Ile Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

20 25 30

Asp Gly Lys His Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr

35 40 45

Thr Lys Ala Leu Ile Tyr His Ala Ser Val Arg Thr Asp Gly Val Pro

50 55 60

Thr Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ser Ile

65 70 75 80

Glu His Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Thr

85 90 95

Leu Lys Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Val Ala Phe Ile

50 55 60

Ser Arg Leu Ile Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Thr Thr Gly Ser Val Phe Asn Ala Met Asp His Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Pro Pro Trp Phe Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Cys Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 37

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ser Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Glu Arg Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Pro Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Asn
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Gly Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

Gln Val Asn Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Arg Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Arg Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Met Pro Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Asn Leu Asp Gly Thr Ile Lys Pro Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly His Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Thr Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 43

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Met

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Ala His Ser Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu

1 5 10 15

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Arg Leu Gln Val

65 70 75 80

Glu Asp Ile Arg Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Ser Ala Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 45

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Thr Val Tyr Ala Asp Ala Val Lys

50 55 60

Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Gln Asn Trp Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Met Leu Thr Gln Gln Ala Glu Ser Leu Trp

130 135 140

Ile Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser

145 150 155 160

Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys His Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175

Pro Gly Gln Thr Thr Lys Ala Leu Ile Tyr His Ala Ser Val Arg Thr

180 185 190

Asp Gly Val Pro Thr Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe

195 200 205

Thr Leu Ser Ile Glu His Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr

210 215 220

Cys Leu Gln Thr Leu Lys Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys

<210> 46

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

Gln Ile Met Leu Thr Gln Gln Ala Glu Ser Leu Trp Ile Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

20 25 30

Asp Gly Lys His Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr

35 40 45

Thr Lys Ala Leu Ile Tyr His Ala Ser Val Arg Thr Asp Gly Val Pro

50 55 60

Thr Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ser Ile

65 70 75 80

Glu His Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Thr

85 90 95

Leu Lys Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser

130 135 140

Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

145 150 155 160

Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Asp Trp Val Ala

165 170 175

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Thr Val Tyr Ala Asp Ala Val Lys Ala

180 185 190

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

195 200 205

Leu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

210 215 220

Ala Gln Asn Trp Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val

225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 47

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Val Ala Phe Ile

50 55 60

Ser Arg Leu Ile Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Thr Thr Gly Ser Val Phe Asn Ala Met Asp His Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu

130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser

145 150 155 160

Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser

165 170 175

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

195 200 205

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

210 215 220

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

225 230 235 240

<210> 48

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser
115 120 125

Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
130 135 140

Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly
165 170 175

Ser Thr Asp Tyr Asn Val Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ile Ile Thr Lys
180 185 190

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala
195 200 205

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Thr Gly Ser Val Phe
210 215 220
Asn Ala Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

<210> 49
<211> 244
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 49

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Pro Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
130 135 140
His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
145 150 155 160
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His
180 185 190
Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe

210 215 220
Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Glu Leu Lys

<210> 50
<211> 244
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 50
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala

20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln
115 120 125

Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
130 135 140
Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys

145 150 155 160
Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala
165 170 175
Thr Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile
180 185 190
Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu
195 200 205
Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly

210 215 220
Ser Ser Tyr Pro Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225 230 235 240
Thr Val Ser Ala

<210> 51
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 51
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Val Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser

130 135 140

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser

145 150 155 160

Val Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys

165 170 175

Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg

180 185 190

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser

195 200 205

Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Cys Cys Phe Gln Gly Ser Gly

210 215 220

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

225 230 235

<210> 52

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Cys Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser

115 120 125

Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr

130 135 140

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln

145 150 155 160

Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn

165 170 175

Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr

180 185 190

Ala Asp Thr Ser Ser Asn Ala Ala Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr

195 200 205

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Ala Tyr Ala

210 215 220

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

225 230 235

<210> 53

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ser Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Glu Arg Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Pro Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met

130 135 140

Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln

145 150 155 160

Asn Val Val Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ser

165 170 175

Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro

180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

195 200 205

Ser Asn Val Gln Ser Gly Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr

210 215 220

Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

225 230 235 240

<210> 54

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Gly Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
145 150 155 160

Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ser Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp
165 170 175

Trp Asn Asp Glu Arg Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Gln Leu Thr
180 185 190

Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser
195 200 205

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Arg
210 215 220

Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

<210> 55
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic
<400> 55
Gln Val Asn Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60
Lys Arg Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Arg Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser
130 135 140
Ser Met Pro Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160
Ser Arg Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Asn Leu Asp
165 170 175
Gly Thr Ile Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly

180 185 190

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu

195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

225 230 235 240

Leu Lys

<210> 56

<211> 242

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Met Pro Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Asn Leu Asp Gly Thr Ile Lys Pro Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Asn Leu Leu Gln

115 120 125

Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys

130 135 140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Phe Trp Val Lys
145 150 155 160

Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Asn
165 170 175

Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Arg Lys Ala Thr Leu

180 185 190

Ser Val Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
195 200 205

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Ala Tyr Tyr
210 215 220

Gly Tyr Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 57

<211> 241

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly His Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Thr Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe

130 135 140

Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser

145 150 155 160

Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln

165 170 175

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val

180 185 190

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr

195 200 205

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln

210 215 220

His Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

225 230 235 240

Lys

<210> 58

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln

115 120 125

Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys

130 135 140

Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys

145 150 155 160

Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu

165 170 175

Asn Gly His Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile

180 185 190

Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu

195 200 205

Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Thr

210 215 220

Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

225 230 235 240

Ser

<210> 59

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 59

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Ala His Ser Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr Ile Thr
145 150 155 160

Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Ser Leu

180 185 190

Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Gln
195 200 205

Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Arg Leu Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Tyr
210 215 220

Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Ser Ala Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Glu Leu Lys

245

<210

> 60

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu

1 5 10 15

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Arg Leu Gln Val

65 70 75 80

Glu Asp Ile Arg Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Ser Ala Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Arg Leu Ser Cys

130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Asn Trp Ile Arg

145 150 155 160

Gln Pro Ala Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys

165 170 175

Ala Ser Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Phe

180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn

195 200 205

Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala His

210 215 220

Ser Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met

225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser

245

<210

> 61

<211> 842

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly

50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln

100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala

145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu

165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu

180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser

195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln

210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly

260 265 270

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

275 280 285

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile

290 295 300

Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

305 310 315 320

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser

325 330 335

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

340 345 350

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln

355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

370 375 380

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
385 390 395 400
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
405 410 415
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
420 425 430
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

435 440 445
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly
450 455 460
Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
465 470 475 480
Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys
485 490 495
Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn

500 505 510
Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr
515 520 525
Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His
530 535 540
Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro
545 550 555 560
Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr

565 570 575
Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His
580 585 590
Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly
595 600 605
Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu
610 615 620
Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn

625 630 635 640

Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly

645 650 655

Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser

660 665 670

Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly

675 680 685

Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser

690 695 700

Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro

705 710 715 720

Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys

725 730 735

Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn

740 745 750

Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr

755 760 765

Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr

770 775 780

Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr

785 790 795 800

Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys

805 810 815

Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu

820 825 830

Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

835 840

<210> 62

<211> 647

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
260 265 270

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
275 280 285

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
290 295 300

Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
305 310 315 320

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
325 330 335

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
340 345 350

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
370 375 380

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
385 390 395 400

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
405 410 415

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
420 425 430

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
435 440 445

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly
450 455 460

Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
465 470 475 480

Asn Pro Gly Pro Arg Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile

485 490 495

Ser Ile Gln Cys Tyr Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr

500 505 510

Glu Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu

515 520 525

Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys

530 535 540

Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr

545 550 555 560

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe

565 570 575

Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile

580 585 590

His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser

595 600 605

Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu

610 615 620

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val

625 630 635 640

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser

645

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

Asp Asn Ser Lys Ser Gln

1 5

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 66

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser

1 5 10 15

Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr

20 25 30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu

35 40 45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly

50 55 60

Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Thr Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn

65 70 75 80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys

85 90 95

Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln

100 105 110

Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met

115 120 125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp

130 135 140

Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile

145 150 155 160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro

165 170 175

Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr

180 185 190

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr

195 200 205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val

210 215

<210> 67

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile

100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

130 135 140

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
145 150 155 160

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
165 170 175

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
180 185 190

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu
195 200 205

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln
210 215 220

Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
225 230 235 240

Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
245 250 255

His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
260 265 270

Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
275 280 285

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
290 295 300

Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala
305 310 315 320

Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
325 330 335

<210> 68

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr Leu

1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His Val

20 25 30

Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala Asn

35 40 45

Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln

50 55 60

Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro

65 70 75 80

Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val

85 90 95

Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn

100 105 110

Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr

115 120 125

Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys

130 135 140

Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr

145 150 155 160

Ser

<210> 69

<211> 1944

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 69

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120

gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240

cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300

gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360

ggcggcggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420

ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540

gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggcctggaat ggctgggcgt gatctggggc 600

agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660

agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720

tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780

accagcgtga ccgtgagcag cgaatctaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctatg 840

ttctgggtgc tggtggtggt cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcaccgtg 900

gccttcatca tcttttgggt gaaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa 960

ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 1020

gaagaagaag aaggaggatg tgaactgagg gtgaagttca gcagaagcgc cgacgcccct 1080

gcctaccagc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctgggcag aagggaagag 1140

tacgacgtcc tggataagcg gagaggccgg gaccctgaga tgggcggcaa gcctcggcgg 1200

aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac 1260

agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320

ggcctgtcca ccgccaccaa ggatacctac gacgccctgc acatgcaggc cctgccccca 1380

aggctcgagg gcggcggaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 1440

aatcccggcc ctaggatgcg gatttccaaa cctcacctgc gctctatctc tatccagtgc 1500

tatctgtgcc tgctgctgaa ctcacatttc ctgaccgaag ccggcatcca cgtgttcatc 1560

ctgggctgct tttccgccgg cctgccaaag accgaggcaa actgggtgaa tgtgatctct 1620

gacctgaaga agatcgagga tctgatccag agcatgcaca tcgacgccac cctgtacaca 1680

gagtccgatg tgcacccttc ttgcaaggtg acagccatga agtgtttcct gctggagctg 1740

caggtcatca gcctggagag cggcgacgcc tctatccacg ataccgtgga gaacctgatc 1800

atcctggcca acaatagcct gagcagcaac ggcaatgtga cagagtccgg ctgcaaggag 1860

tgtgaggagc tggaggagaa gaatatcaaa gagttcctgc agtcattcgt ccatatcgtc 1920

cagatgttta tcaatacctc ctaa 1944

<210> 70

<211> 725

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 70

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln

210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
260 265 270
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
275 280 285

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
290 295 300
Phe Trp Val Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser
305 310 315 320
Pro Lys Glu Phe Leu Thr Ile Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr
325 330 335
Arg Arg Asn His Glu Gln Glu Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr
340 345 350

Ile Tyr Ser Met Ile Gln Ser Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu
355 360 365
Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly
370 375 380
Ser Arg Lys Arg Asn His Ser Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu
385 390 395 400
Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser
405 410 415

Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser Arg Val Lys Phe Ser
420 425 430
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
435 440 445
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
450 455 460

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
465 470 475 480

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
485 490 495
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
500 505 510
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
515 520 525
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly
530 535 540

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
545 550 555 560
Gly Pro Arg Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile
565 570 575
Gln Cys Tyr Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala
580 585 590
Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys
595 600 605

Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu
610 615 620
Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser
625 630 635 640
Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu
645 650 655
Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp
660 665 670

Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn
675 680 685
Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu
690 695 700
Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met

705 710 715 720

Phe Ile Asn Thr Ser

725

<210> 71

<211> 2177

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 71

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120

gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240

cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300

gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360

ggcggcggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420

ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540

gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggcctggaat ggctgggcgt gatctggggc 600

agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660

agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720

tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780

accagcgtga ccgtgagcag cgaatctaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctatg 840

ttctgggtgc tggtggtggt cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcaccgtg 900

gccttcatca tcttttgggt gtggaggagg aagaggaagg agaagcagag cgagacaagc 960

cctaaggagt ttctgacaat ctatgaagac gtgaaggacc tgaagacacg gagaaaccac 1020

gagcaggagc agaccttccc tggaggaggc agcacaatct actccatgat ccagtctcag 1080

agcagcgccc ccacctccca ggagcctgcc tacacactgt atagcctgat ccagccatcc 1140

cggaagtctg gcagcaggaa gcgcaaccac tccccctctt ttaattctac catctatgaa 1200

gtgatcggca agagccagcc caaggcacag aaccccgcac gactgagcag gaaggaactg 1260

gagaactttg atgtctactc tagggtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc ccctgcctac 1320

cagcagggcc agaatcagct gtacaacgag ctgaacctgg gcagaaggga agagtacgac 1380

gtcctggata agcggagagg ccgggaccct gagatgggcg gcaagcctcg gcggaagaac 1440

ccccaggaag gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag 1500

atcggcatga agggcgagcg gaggcggggc aagggccacg acggcctgta tcagggcctg 1560

tccaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggccctgcc cccaaggctc 1620

gagggcggcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga gagaatcccg 1680

gccctaggat gcggatttcc aaacctcacc tgcgctctat ctctatccag tgctatctgt 1740

gcctgctgct gaactcacat ttcctgaccg aagccggcat ccacgtgttc atcctgggct 1800

gcttttccgc cggcctgcca aagaccgagg caaactgggt gaatgtgatc tctgacctga 1860

agaagatcga ggatctgatc cagagcatgc acatcgacgc caccctgtac acagagtccg 1920

atgtgcaccc ttcttgcaag gtgacagcca tgaagtgttt cctgctggag ctgcaggtca 1980

tcagcctgga gagcggcgac gcctctatcc acgataccgt ggagaacctg atcatcctgg 2040

ccaacaatag cctgagcagc aacggcaatg tgacagagtc cggctgcaag gagtgtgagg 2100

agctggagga gaagaatatc aaagagttcc tgcagtcatt cgtccatatc gtccagatgt 2160

ttatcaatac ctcctaa 2177

<210> 72

<211> 640

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 72

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
260 265 270
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala
275 280 285

Val Ala Met Gly Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Thr Lys Arg Gly Arg
290 295 300
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
305 310 315 320
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
325 330 335

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
340 345 350

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
355 360 365
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
370 375 380
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
385 390 395 400
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
405 410 415

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
420 425 430
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
435 440 445
Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser
450 455 460
Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Arg
465 470 475 480

Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr Leu Cys
485 490 495
Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His Val Phe
500 505 510
Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp
515 520 525
Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser
530 535 540

Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser
545 550 555 560
Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile
565 570 575
Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu

580 585 590

Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu

595 600 605

Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu

610 615 620

Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser

625 630 635 640

<210> 73

<211> 1923

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 73

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120

gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240

cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300

gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360

ggcggcggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420

ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540

gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggcctggaat ggctgggcgt gatctggggc 600

agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660

agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720

tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780

accagcgtga ccgtgagcag cgaatctaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctccc 840

ttctttttct gctgttttat cgccgtggct atgggcatcc ggttcatcat catggtgacc 900

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 960

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 1020

gaactgaggg tgaagttcag cagaagcgcc gacgcccctg cctaccagca gggccagaat 1080

cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga agggaagagt acgacgtcct ggataagcgg 1140

agaggccggg accctgagat gggcggcaag cctcggcgga agaaccccca ggaaggcctg 1200

tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc 1260

gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag 1320

gatacctacg acgccctgca catgcaggcc ctgccccaa ggctcgaggg cggcggagag 1380

ggcagaggaa gtcttctaac atgcggtgac gtggaggaga atcccggccc taggatgcgg 1440

atttccaaac ctcacctgcg ctctatctct atccagtgct atctgtgcct gctgctgaac 1500

tcacatttcc tgaccgaagc cggcatccac gtgttcatcc tgggctgctt ttccgccggc 1560

ctgccaaaga ccgaggcaaa ctgggtgaat gtgatctctg acctgaagaa gatcgaggat 1620

ctgatccaga gcatgcacat cgacgccacc ctgtacacag agtccgatgt gcacccttct 1680

tgcaaggtga cagccatgaa gtgtttcctg ctggagctgc aggtcatcag cctggagagc 1740

ggcgacgcct ctatccacga taccgtggag aacctgatca tcctggccaa caatagcctg 1800

agcagcaacg gcaatgtgac agagtccggc tgcaaggagt gtgaggagct ggaggagaag 1860

aatatcaaag agttcctgca gtcattcgtc catatcgtcc agatgtttat caatacctcc 1920

taa 1923

<210> 74

<211> 718

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly

50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln

100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala

145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu

165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu

180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser

195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln

210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly

260 265 270

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala

275 280 285

Val Ala Met Gly Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Thr Trp Arg Arg Lys

290 295 300

Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Pro Lys Glu Phe Leu Thr Ile

305 310 315 320

Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr Arg Arg Asn His Glu Gln Glu

325 330 335

Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Ser Met Ile Gln Ser

340 345 350

Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser

355 360 365

Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser Arg Lys Arg Asn His Ser

370 375 380

Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro

385 390 395 400

Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe

405 410 415

Asp Val Tyr Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala

420 425 430

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg

435 440 445

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu

450 455 460

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

465 470 475 480

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

485 490 495

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

500 505 510

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

515 520 525

Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu

530 535 540

Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Arg Ile Ser

545 550 555 560

Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr Leu Cys Leu Leu

565 570 575

Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu

580 585 590

Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn

595 600 605

Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His

610 615 620

Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys

625 630 635 640

Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu

645 650 655

Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile

660 665 670

Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly

675 680 685

Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu

690 695 700

Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser

705 710 715

<210> 75

<211> 2157

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120

gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240

cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300

gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360

ggcggcggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420

ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540

gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggcctggaat ggctgggcgt gatctggggc 600

agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660

agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720

tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780

accagcgtga ccgtgagcag cgaatctaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctccc 840

ttctttttct gctgttttat cgccgtggct atgggcatcc ggttcatcat catggtgacc 900

tggaggagga agaggaagga gaagcagagc gagacaagcc ctaaggagtt tctgacaatc 960

tatgaagacg tgaaggacct gaagacacgg agaaaccacg agcaggagca gaccttccct 1020

ggaggaggca gcacaatcta ctccatgatc cagtctcaga gcagcgcccc cacctcccag 1080

gagcctgcct acacactgta tagcctgatc cagccatccc ggaagtctgg cagcaggaag 1140

cgcaaccact ccccctcttt taattctacc atctatgaag tgatcggcaa gagccagccc 1200

aaggcacaga accccgcacg actgagcagg aaggaactgg agaactttga tgtctactct 1260

agggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 1320

tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gagtacgacg tcctggataa gcggagaggc 1380

cgggaccctg agatgggcgg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 1440

gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 1500

aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 1560

tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaaggctcg agggcggcgg agagggcaga 1620

ggaagtcttc taacatgcgg tgacgtggag gagaatcccg gccctaggat gcggatttcc 1680

aaacctcacc tgcgctctat ctctatccag tgctatctgt gcctgctgct gaactcacat 1740

ttcctgaccg aagccggcat ccacgtgttc atcctgggct gcttttccgc cggcctgcca 1800

aagaccgagg caaactgggt gaatgtgatc tctgacctga agaagatcga ggatctgatc 1860

cagagcatgc acatcgacgc caccctgtac acagagtccg atgtgcaccc ttcttgcaag 1920

gtgacagcca tgaagtgttt cctgctggag ctgcaggtca tcagcctgga gagcggcgac 1980

gcctctatcc acgataccgt ggagaacctg atcatcctgg ccaacaatag cctgagcagc 2040

aacggcaatg tgacagagtc cggctgcaag gagtgtgagg agctggagga gaagaatatc 2100

aaagagttcc tgcagtcatt cgtccatatc gtccagatgt ttatcaatac ctcctaa 2157